

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria**



**TESIS DOCTORAL**

**Relación entre alcoholemia, etilglucurónico y hepatopatía en cadáveres  
del Instituto Anatómico Forense de Madrid y su utilidad forense en la  
valoración del consumo de alcohol**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**César Yoshi López Matayoshi**

Directores

**Eduardo Arroyo Pardo  
Luis Juan Segura Abad**

**Madrid, 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y LEGISLACIÓN SANITARIA**



**Relación entre alcoholemia, etilglucurónido y  
hepatopatía en cadáveres del Instituto Anatómico  
Forense de Madrid y su utilidad forense en la  
valoración del consumo de alcohol.**

**TESIS DOCTORAL**

**César Yoshi López Matayoshi**

Madrid, 2015



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y LEGISLACIÓN SANITARIA**



**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**César Yoshi López Matayoshi**

Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2015

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria  
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la  
dirección de los Doctores

***Eduardo Arroyo Pardo***

***Luis Juan Segura Abad***

VºBº Directores de Tesis

**Dr. Eduardo Arroyo Pardo**

**Dr. Luis Juan Segura Abad**

VºBº Doctorando

**César Yoshi López Matayoshi**



## ***Dedicatoria***

A la memoria de Hidetada, Akiko, Isabel, Rosa, Juan, Eduardo y Santiago.

# Agradecimientos

A la señora Angélica Matayoshi Nakada por sus enseñanzas, por mostrarme que el esfuerzo diario permite cosechar grandes resultados en la vida. Tu ejemplo me permite avanzar y afianzar la vida que quiero...gracias mamá.

Al Dr. Luis Segura Abad, por ser director de esta tesis, por abrirme las puertas del emocionante mundo de la Toxicología Forense, por sus enseñanzas, por las anécdotas compartidas y por confiar en mí para desarrollar este trabajo experimental...gracias Luis.

Al Dr. Eduardo Arroyo Pardo, por ser director de esta Tesis, por tu apuesta en esta Tesis, por tu estímulo para continuar con mi trabajo, y por tu ilimitada y constante ayuda cuando los problemas se presentaron...gracias Eduardo.

Sin la colaboración constante del Grupo de Investigación de Genética Forense y Genética de Poblaciones esta Tesis no podría haberse financiado; su participación en las actividades académicas permitió el nacimiento de esta Tesis...gracias Ana por tu preocupación, gracias Carlos por tu interés, gracias Sara por tu constante respaldo y por esas charlas con café; para Miriam, Eva y Cristina por su amistad.

Para María Ruiz-Herrera Verano, porque me permitió participar, por primera vez, en las actividades del grupo GenForen, por su amistad y cariño...gracias killa.

El apoyo incondicional de Cláudia Lopes Gomes permitió la finalización de esta Tesis; por tu cariño, confianza y apoyo diario...gracias Claudinha.

A los profesores del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria por su preocupación en que esta Tesis continúe y finalice.

Agradecer a los analistas del laboratorio de toxicología y bioquímica del Instituto Anatómico Forense de Madrid, por su colaboración, por todo lo compartido durante mi trabajo en el laboratorio...gracias M<sup>a</sup> José, gracias Gemma y gracias Israel.

La amistad, confianza y cariño de la Dra. Concepción Magaña incrementó las fuerzas necesarias para finalizar esta Tesis...gracias Concha.

A todo el personal de IAF-Madrid, a su Director por autorizar la realización de esta Tesis, a los técnicos por su preocupación durante la recogida de las muestras, al personal administrativo por colaborar en la recogida de los datos...gracias a todos.

A la Dra. Carmen Pulido, en representación de todos los médicos forenses que han colaborado con este proyecto de investigación...gracias infinitas por su colaboración.



A la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Fernández Aceñero por su colaboración con su eficiente labor con el diagnóstico de muestras y a la Dr<sup>a</sup> Concepción Millana por su entusiasmo para desarrollar este proyecto.

Al Grupo de Neurobiología de la Audición del Dpto. de Oftalmología y Otorrinolaringología, por su colaboración con la preparación de las muestras. En especial a Encarnación Muñoz Ferrero por su dedicación y empeño.

A mi familia en Perú por su constante aliento para continuar este proyecto.

A los que considero mi familia aquí en España por su cariño y ánimo para con mi trabajo diario.

No puedo finalizar estos agradecimientos sin mencionar a los amigos que se empeñaron en demostrar su confianza en mí.



---

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	17
1. Antecedentes.....	18
2. Alcohol.....	25
2.1 Fermentación alcohólica.....	28
2.2 Producción de bebidas alcohólicas.....	29
2.2.1 Producción de cerveza.....	30
2.2.2 Producción de vinos y sus variedades.....	31
2.2.3 Producción de bebidas espirituosas.....	33
2.3 Determinación de etanol.....	33
3. Consumo y dependencia del etanol.....	39
3.1 Dependencia al etanol.....	40
3.2 Patologías producidas por el etanol.....	43
4. Legislación relacionada con el consumo de alcohol.....	47
5. Metabolismo del etanol.....	52

5.1 Marcadores directos del etanol.	55
5.2 Marcadores indirectos del etanol.	57
6. Etilglucuronido	61
6.1 El etilglucurónido en el organismo humano	62
6.2 Determinación de etilglucurónido en sangre, orina y pelo	64
<b>OBJETIVOS.....</b>	67
1. Justificación	68
2. Hipótesis	68
3. Objetivo general	68
4. Objetivos específicos	69
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	70
1. Diseño experimental.	71
2. Población de estudio o casos seleccionados.	76
2.1 Criterios de los casos seleccionados.	76
2.2 Datos generales de los casos seleccionados.	77
3. Muestra del estudio o casos analizados.	78
3.1 Datos específicos de los casos analizados.	80
4. Recogida de muestras.	82
4.1 Criterios para la recogida de muestras.	82
4.2 Procedimiento para la recogida de muestras.	82
4.2.1 Recogida de sangre.	83
4.2.2 Recogida de orina.	84

---

4.2.3 Recogida de pelo.	85
4.2.4 Recogida de hígado.	87
5. Determinación de la alcoholemia.	88
5.1 Protocolo analítico.	88
A. Instrumento analítico.	88
B. Disoluciones estándares.	89
C. Muestras controles.	91
D. Muestras forenses.	94
6. Determinación de etilglucuronido.	95
6.1 Instrumento analítico.	95
6.2 Ensayos preliminares.	96
6.3 Protocolo analítico.	97
A. condiciones analíticas del lc–ms/ms.	97
B. Disoluciones estándares.	99
C. Muestras de calibración.	99
D. Pre tratamiento de muestras.	102
E. Extracción de etilglucuronido.	104
F. Ensayos finales de muestras.	105
7. Diagnostico hepático.	110
8. Análisis estadístico.	111
8.1 Variables de la muestra.	111
8.2 Técnicas para el análisis estadístico.	112

---

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	115
1. Muestra: casos analizados	116
2. Determinación de la alcoholemia	120
2.1 Determinación de etanol en muestras de sangre.	120
2.2 Determinación de acetaldehído en muestras de sangre.	123
2.3 Determinación de otros volátiles en muestras de sangre.	126
3. Determinación de etilglucuronido	128
3.1 Determinación de etg en muestras forenses de orina.	128
3.2 Determinación de etg en muestras forenses de sangre.	130
3.3 Determinación de etg en muestras forenses de pelo.	133
4. Diagnostico histopatológico	137
5. Analisis estadístico	140
<b>CONCLUSIONES.....</b>	156
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	161

---

# ÍNDICE de FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura general de los alcoholes.....	25
<b>Figura 2:</b> Estructura general del etanol.....	25
<b>Figura 3:</b> Síntesis de etanol por hidratación de eteno.....	27
<b>Figura 4:</b> Síntesis de etanol por hidrobtoración de eteno.....	27
<b>Figura 5:</b> Síntesis de etanol por hidrólisis de halogenuros.....	27
<b>Figura 6:</b> Síntesis de etanol con reactivo de Grignard.....	27
<b>Figura 7:</b> Transformación de glucosa hasta ácido pirúvico.....	28
<b>Figura 8:</b> Balance general de la respiración celular.....	29
<b>Figura 9:</b> Balance general de la fermentación alcohólica.....	29
<b>Figura 10:</b> Proceso de la fermentación alcohólica.....	31
<b>Figura 11:</b> Etapas de la producción de cerveza.....	31
<b>Figura 12:</b> Etapas de la producción de vino.....	32
<b>Figura 13:</b> Reacción entre el etanol y el dicromato.....	35
<b>Figura 14:</b> Reacción enzimática del etanol.....	35
<b>Figura 15:</b> Fórmula del cálculo de la alcoholemia teórica máxima.....	50
<b>Figura 16:</b> Representación general de la curva de alcoholemia.....	51
<b>Figura 17:</b> Fórmula de Widmark para el cálculo de la alcoholemia teórica.....	51
<b>Figura 18:</b> Fórmula utilizando el coeficiente de eliminación de Widmark (W).....	51
<b>Figura 19:</b> Fórmula utilizando el coeficiente de eliminación de Dubowski (D).....	51

<b>Figura 20:</b> Oxidación del etanol por el sistema catalasa.....	52
<b>Figura 21:</b> Oxidación del etanol por el sistema MEOS.....	53
<b>Figura 22:</b> Procesos patológicos por el exceso de consumo de etanol.....	53
<b>Figura 23:</b> Estructura del ácido glucurónico.....	61
<b>Figura 24:</b> Estructura del etilglucurónido.....	61
<b>Figura 25:</b> Reacción de biotransformación (conjugación) del etilglucurónido.....	62
<b>Figura 26:</b> Relación entre caso judicial, muestra forense recogida y tipo de análisis a realizar.	72
<b>Figura 27:</b> Gráfico de la relación entre población (N=208 casos) y muestra (n=73 casos).....	78
<b>Figura 28</b> Sangre y orina posterior a su respectiva recogida, envasado con KF0,1%.....	84
<b>Figura 29</b> Muestra de orina recogida y distribuida en tubos de plástico para su congelación...	86
<b>Figura 30:</b> Muestras de pelo, recogidas y listas para su refrigeración.....	86
<b>Figura 31:</b> Muestras de hígado y su respectivo envase con formaldehído 4% (pH = 7).....	87
<b>Figura 32:</b> Cromatograma que muestra cada pico cromatográfico de los volátiles identificados después del análisis por HS – GC- FID.....	91
<b>Figura 33:</b> Recta de calibración del etanol, ( $R^2 = 0,9983$ ).....	93
<b>Figura 34:</b> Recta de calibración del acetaldehído, ( $R^2 = 0,9998$ ).....	93
<b>Figura 35</b> Muestras de sangre, orina y pelo de un mismo caso, caso negativo para EtG, utilizadas para diseñar las respectivas muestras de calibración.....	101
<b>Figura 36:</b> Cromatograma de la muestra de orina analizada, por LC-MS/MS, durante los ensayos preliminares. Se identifica la presencia de EtG-D <sub>5</sub> , agregado a la muestra, y la ausencia de EtG.....	101
<b>Figura 37:</b> Muestra de pelo después de ser homogenizada, hasta lograr su tamaño mínimo.....	103
<b>Figura 38:</b> Muestras de calibración de sangre pre tratadas, antes del proceso de extracción por fase solida utilizando columnas BIOTAGE® Evolute® AX-50 100 mg 3mL.....	103



---

<b>Figura 39:</b> Recta de calibración para la cuantificación de EtG en orina, ( $R^2=0,9982$ ).....	106
<b>Figura 40:</b> Recta de calibración para la cuantificación de EtG en sangre, ( $R^2=0,9974$ ).....	107
<b>Figura 41:</b> Recta de calibración para la cuantificación de EtG en pelo, ( $R^2=0,9985$ ).....	108
<b>Figura 42:</b> Parámetros para la integración del área bajo la curva del pico cromatográfico (RT=2,52) que representa la transición 84,90 del etilglucurónido.....	109
<b>Figura 43:</b> Gráfica que representa la recta de predicción para la relación entre EtOH sangre y EtG sangre, en muestras de cadáveres.....	149
<b>Figura 44:</b> Gráfica donde se representa el árbol de decisión obtenido por el método CHAID exhaustivo, que representa una secuencia de sucesos que relacionan la variable dependiente (EtOHsangre) y la variable independiente (EtGsangre).....	152
<b>Figura 45:</b> Gráfica donde se representa el árbol de decisión obtenido por el método CRT, que representa una secuencia de sucesos que relacionan la variable dependiente (EtOH sangre) y las variables independientes (EtG sangre y Diagnóstico).....	153

---

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Descripción detallada del diseño experimental.....	74
<b>Tabla 2:</b> Relación entre número de autopsias, número de casos y número de muestras judiciales (años 2009 – 2014).....	75
<b>Tabla 3:</b> Total de casos analizados distribuidos según el sexo.....	79
<b>Tabla 4:</b> Total de casos analizados distribuidos según la edad.....	79
<b>Tabla 5:</b> Total de casos analizados distribuidos según la etiología de la muerte.....	79
<b>Tabla 6:</b> Total de casos analizados distribuidos según el tiempo de recogida de la muestra...	80
<b>Tabla 7:</b> Total de casos analizados distribuidos según el tipo de dependencia.....	80
<b>Tabla 8:</b> Tabla de los parámetros analíticos del cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama y acoplado a un auto-muestreador de espacio en cabeza...	89
<b>Tabla 9:</b> Relación de la señal cromatográfica y la concentración de etanol, mostrando los valores de las señales del estándar interno.....	92
<b>Tabla 10:</b> Relación de la señal cromatográfica y la concentración de acetaldehído, mostrando los valores de las señales del estándar interno.....	92
<b>Tabla 11:</b> Parámetros para el cromatógrafo líquido.....	97
<b>Tabla 12:</b> Parámetros para el espectrómetro de masas en tandem.....	98
<b>Tabla 13:</b> Volúmenes necesarios para preparar las muestras de calibración para la determinación de etilglucurónido.....	100
<b>Tabla 14:</b> Procedimiento para la extracción de EtG según BIOTAGE®.....	104
<b>Tabla 15:</b> Resultados utilizados para diseñar la recta de calibración para la cuantificación de EtG en orina. Cada muestra de calibración fue analizada por duplicado.....	106
<b>Tabla 16:</b> Resultados utilizados para diseñar la recta de calibración para la cuantificación de EtG en sangre. Cada muestra de calibración fue analizada por duplicado...	107
<b>Tabla 17:</b> Resultados utilizados para diseñar la recta de calibración para la cuantificación de EtG en pelo. Cada muestra de calibración fue analizada por duplicado.....	108

<b>Tabla 18:</b> Datos de los 73 casos analizados y con sus respectivos datos relacionados según su autopsia judicial, resaltando los 2 casos donde se desconocía la edad del cadáver.....	117
<b>Tabla 19:</b> Tabla que muestra los casos con resultados positivos para EtG en sangre y los 2 casos donde no se pudo recoger muestras de sangre.....	120
<b>Tabla 20:</b> Casos con resultados positivos para acetaldehído en sangre y los 2 casos donde no se pudo recoger muestras de sangre.....	123
<b>Tabla 21:</b> Casos con resultados positivos para EtG en orina.....	129
<b>Tabla 22:</b> Casos con resultados positivos para EtG en sangre y los 2 casos donde no se pudo recoger muestras de sangre.....	131
<b>Tabla 23:</b> Casos con resultados positivos para EtG en pelo y los 13 casos donde no se pudo recoger muestras de pelo.....	134
<b>Tabla 24:</b> Resultados del diagnóstico específico hepático, en los casos donde se pudo recoger las respectivas muestras.....	137
<b>Tabla 25:</b> Tabla con los resultados de la correlación de Spearman para rangos de EtOH en y acetaldehído en sangre, comparados con los rangos para los niveles de EtG en cada muestra en sangre orina y pelo, de cadáveres.....	141
<b>Tabla 26:</b> Resultados estadísticos de la correlación de Spearman para los rangos de EtOH sangre y AcCHO sangre, comparados con los rangos para los niveles de EtG orina, EtG orina y EtG pelo, en muestras de cadáveres.....	142
<b>Tabla 27:</b> Categorización de la variable objetivo (EtOH sangre), para el análisis de las varianzas con un factor (test ANOVA F).....	143
<b>Tabla 28:</b> Resultados de la prueba ANOVA F comparando los valores de AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo en los rangos de EtOH sangre, en muestras forenses.....	144
<b>Tabla 29:</b> Resultados de la prueba de Duncan, comparando los niveles de AcCHO sangre en los rangos establecidos de EtOH sangre, en muestras de cadáveres.....	145
<b>Tabla 30:</b> Resultados de la prueba de Duncan, comparando los niveles de EtG orina en los rangos establecidos de EtOH sangre, en muestras de cadáveres.....	145
<b>Tabla 31:</b> Resultados de la prueba de Duncan, comparando los niveles de EtG pelo en los rangos establecidos de EtOH sangre, en muestras de cadáveres.....	146
<b>Tabla 32:</b> Resultados de la prueba de Duncan, comparando los niveles de EtG sangre en los rangos establecidos de EtOH sangre, en muestras de cadáveres.....	146
<b>Tabla 33:</b> Resultados de la prueba de Duncan para la comparación de los grupos diagnóstico histopatológico y EtG en orina, de cadáveres.....	147
<b>Tabla 34:</b> Resultados de la prueba Kruskal–Wallis comparando los niveles de AcCHO sangre, EtG sangre, EtG orina y EtG pelo en los rangos establecidos de EtOH	148

---

---

sangre, en muestras de cadáveres.....	
<b>Tabla 35:</b> Tablas donde se muestran los parámetros estadísticos para el ajuste de la recta de predicción lineal de la relación entre EtOH en sangre y EtG sangre, en muestras de cadáveres.....	150
<b>Tabla 36:</b> Resultados del pronóstico general, por el método de crecimiento CHAID exhaustivo, para la relación entre EtOH en sangre y EtG sangre, en muestras de cadáveres.....	152
<b>Tabla 37:</b> Resultados del pronóstico general, por el método de crecimiento CRT, para la relación entre EtOH en sangre y EtG sangre, en muestras de cadáveres.....	154

---

# ABREVIATURAS

## Unidades

- [ ] Concentración Química.
- °C Grado centígrados.
- °GL Grado Gay Lussac.
- % Vol Volumen porcentual
- A.C. Antes de Cristo.
- g Gramo(s).
- g/mol Gramos por mol
- g/L Gramos por litro
- Kg Kilogramo(s).
- L Litro(s).
- mg Miligramo(s).
- mg/L Miligramos por litro
- mg/mL Miligramos por mililitro
- mL Mililitro(s).
- min Minuto(s).
- mm Milimetro(s).
- pg Picogramo(s).
- ppm Partes por millón.
- µg Microgramo(s).
- µL Microlitro(s).

- 
- V Voltio(s)
  - Vol Volumen.
  - Torr Torr

## Compuestos Químicos

• 5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético.
• 5-HTOL	5-hidroxitriptofol.
• AcCHO	Acetaldehído.
• ACN	Acetonitrilo.
• ADH	Enzima alcohol deshidrogenasa.
• ALDH	Enzima aldehído deshidrogenasa.
• AVP	Arginina vasopresina.
• Alc	Alcohol
• ALD	<i>Alcoholic liver disease</i>
• ALT	Alanito-aminotransferasa.
• AST	Aspartato-aminotransferasa.
• ATP	Adenosina tri-fosfato.
• CDT	Transferrina deficiente de carbohidratos.
• CE	Cocaetileno.
• EBE	Etilbenzoilecgonina.
• EEAG	Esteres etílicos de los ácidos grasos.
• EtG	Etilglucurónido o <i>ethyl-β-D-glucopyranosiduronic acid</i>
• EtG-D <sub>5</sub>	<i>ethyl-β-D-glucopyranosiduronic acid – D<sub>5</sub></i>
• EtOH	Etanol.

• EtS	Etilsulfato
• FAEE`s	<i>Fatty Acid Ethyl Esters.</i>
• GGT	Gamma-glutamilttransferasa.
• GOT	Glutamato oxalacetato transaminasa.
• GPT	Glutamato piruvato transaminase.
• HAD	hormona antidiurética
• HDL	<i>High Density Lipoprotein.</i>
• KF	Fluoruro de potasio.
• LSD	Dietilamida de ácido lisérgico.
• MeOH	Metanol.
• N <sub>2</sub>	Nitrógeno.
• NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (oxidada).
• NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducida).
• NADPH	coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
• -OH	Oxhidrilo o hidroxilo.
• PE	Fosfatidiletanol.
• PEth	<i>Phosphatidylethanol.</i>
• TIQs	Tetrahidroisoquinolinas.
• UGT	Uridina difosfato–glucuronosiltransferasa.

## Otras Abreviaturas

• ACS	<i>American Chemical Society</i>
• ALD	<i>Alcoholic liver disease.</i>
• BAC	<i>Blood Alcohol Content.</i>
• C	Zona Cardíaca
• CAP	<i>Adulto per cápita.</i>
• CAS	Chemical Abstracts Service.
• CE	Energía de colisión.
• DFG	<i>Deutsche Forschungsgemeinschaft.</i>
• DP	Potencial de desagrupación (separación)
• DSM-IV-TR®	Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, 4º edición, texto revisado.
• DSM-5®	Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, 5º edición.
• DTS	Departamento de trabajo social.
• E	Zona Encefálica
• EP	Potencial de entrada.
• F.E.B.E.	Federación Española de Bebidas Espirituosas.
• FDA	<i>Food and Drugs Administration.</i>
• FID	Detector de ionización de la flama.
• HS	Automuestreador de espacio en cabeza o <i>Head Space.</i>
• GC	Cromatógrafo de gases.
• gl	<i>Grados de libertad</i>
• GSRAH	<i>The Global status report on alcohol and health.</i>
• HCSC	Hospital Clínico San Carlos.
• IAF-MADRID	Instituto Anatómico Forense de Madrid.



• IARC	<i>International Agency for Research on Cancer.</i>
• ICAP	<i>International Center for Alcohol Policies.</i>
• INTCF	Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.
• ISO	Normativa ISO
• JUZGADOS	Juzgados de Instrucción de Madrid.
• Ka	Constante de equilibrio ácido.
• LC	Cromatógrafo líquido.
• MS/MS	Espectrometría de masas en tandem
• LOD	<i>Limit of Detection.</i>
• LOQ	<i>Limit of Quantification.</i>
• LLOQ	<i>Lower Limit of Quantification.</i>
• MCV	Volumen corpuscular medio.
• MEOS	<i>Microsomal Ethanol Oxidizing System.</i>
• MMFF	Médicos forenses.
• MS	Detector de masas.
• MS/MS	Espectrómetro de masas en tandem.
• MSB	<i>Management of Substance Abuse Team.</i>
• MSD	<i>Department of Mental Health and Substance Abuse.</i>
• NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease.</i>
• NIAAA	<i>National Institute for Alcohol Abuse and Alcoholism.</i>
• NTP	Norma Técnica de Prevención.
• OMS	Organización Mundial de la Salud.
• PA	Para análisis.
• PAI	Para análisis instrumental.

---

---

• pK	Potencial de la constante de disociación.
• qr	Test de Duncan
• r	Coeficientes de correlación de Pearson
• RAE	Real Academia de la Lengua Española.
• RPE	Reagente di grado analítico
• rpm	Revoluciones por minuto.
• rs	Coeficientes de correlación de Spearman
• RT	<i>Retention time.</i>
• SoHT	<i>Society of Hair Testing.</i>
• SPE	<i>Solid phase extraction.</i>
• St	Estándar
• St <sub>int</sub>	Estándar interno.
• TLV	<i>Threshold Limit Value.</i>
• TWA	<i>Time-weighted average.</i>
• USC	Universidad de Santiago de Compostela
• VLA-EC	Valor límite ambiental de exposición corta.
• X <sup>2</sup>	Chi cuadrado



---

## Resumen

El consumo abusivo de alcohol (etanol), por la ingesta de bebidas alcohólicas, es en la actualidad generador de riesgos en el ámbito social, familiar, clínico, psicopatológico y para el tráfico vial.

El *Management of Substance Abuse Team* del Departamento de Salud Mental y Sustancias de Abuso de la Organización Mundial de la Salud (OMS), identifica al consumo abusivo de alcohol como objetivo para la Salud Pública y lo denomina “*the harmful use of alcohol*” o “uso perjudicial o nocivo del alcohol”. En el 2011, la OMS publicó “*The Global status report on alcohol and health*”, donde se confirmó que el “uso perjudicial o nocivo del alcohol” es factor generador de: enfermedades, violencia, lesiones y muerte.

Por otro lado, se considera que el consumo abusivo de etanol, es el consumo excesivo del alcohol proveniente de una bebida alcohólica reglamentada. Todas las acciones de riesgo que se cometen bajo la influencia del etanol, tienen gran trascendencia en el ámbito médico legal y forense ya que producen respuestas jurídicas específicas en los distintos campos del Derecho, como la imputabilidad penal, la capacidad civil, o la guarda y custodia de posibles hijos. Efectivamente, los riesgos por el consumo de alcohol pueden incrementarse todavía más, siendo importante diferenciar al bebedor habitual del bebedor excesivo para tomar medidas preventivas frente a diferentes situaciones producidas por la ingesta de las bebidas alcohólicas.

Durante el consumo excesivo y posteriormente crónico, se producen cambios fisiológicos en el bebedor, los cuales pueden finalizar en una dependencia alcohólica (alcoholismo). Esta tiene una trascendencia legal muy importante hasta el grado de involucrar al ambiente y la sociedad que rodean al individuo dependiente.

Así, es importante la determinación de un protocolo para diagnosticar el consumo de etanol y así poder identificar al individuo con consumo patológico, previniendo acciones que sean contrarias a las leyes y normativas jurídicas. Un procedimiento correcto para diagnosticar el consumo de etanol, sería la cuantificación de marcadores de su consumo agudo y crónico, relacionando estos resultados con el diagnóstico histopatológico e incluir el uso de muestras que permitan realizar una valoración retrospectiva, determinando el consumo de etanol a lo largo de un período de tiempo determinado.

---

Naturalmente, considerando el consumo de bebidas alcohólicas, la vía de absorción más importante es la oral. Del total de etanol que ingresa, el 70% es absorbido al organismo en los intestinos, después se distribuye por el sistema porta al corazón y por el sistema circulatorio a todo el organismo. Durante esta distribución se produce el anabolismo y el catabolismo del etanol para producir diferentes metabolitos. En teoría la determinación de la alcoholemia, mide la cantidad de etanol distribuido por la sangre en el momento de la recogida de la muestra. Terminado el metabolismo, el 95% del etanol inicial se puede eliminar como metabolito, un 3% se puede eliminar como etanol sin metabolizar y el resto se puede acumular en el organismo.

Por otro lado, cuando se desea conocer la alcoholemia de un individuo, es importante cuantificar la cantidad de etanol que circula por la sangre del sujeto y es recomendable que la metodología analítica a utilizar sea la CG/FID o un automuestreador de espacio en cabeza o *Head Space* como método para la extracción del etanol en la muestra biológica.

Así, la determinación de etanol se puede realizar en diversas muestras biológicas, como la sangre, orina, aire espirado, saliva, humor vítreo u otras muestras. Cada muestra tiene sus ventajas y desventajas, que incluyen la concentración del marcador que se cuantificará en esa muestra, el método analítico a seguir, el tratamiento que se debe seguir para trabajar con esa muestra o la valoración que se desea realizar con los resultados obtenidos por analizar una muestra en particular. Por marcador analítico de etanol se entiende el compuesto químico que se cuantificará para comprobar el consumo de alcohol y valorar lo ocurrido durante la intoxicación alcohólica en un acto delictivo, un proceso administrativo o un proceso laboral. Existen diversos tipos de marcadores, indirectos y directos. En el presente trabajo nos centraremos en el estudio de uno de los marcadores directos del consumo de alcohol, el etilglucurónido (EtG).

El EtG se produce por biosíntesis en el hígado. Cuando en el medio hay una concentración elevada de etanol, este se conjuga por un proceso de anabolismo con el ácido glucurónico. La importancia de relacionar los niveles de EtG con el tipo de consumo, se explica si entendemos que aproximadamente el 95% del etanol absorbido se biotransforma en acetaldehído y que del etanol restante, una fracción muy pequeña puede conjugarse con el ácido glucurónico y formar el EtG. Un consumo elevado de etanol aumentará la fracción muy pequeña y por lo tanto la cantidad de EtG aumentará y podrá ser detectable en equipos instrumentales con alta sensibilidad.

---

En la presente Tesis la hipótesis consiste en que en muestras post mortem existe la posibilidad de relacionar: la alcoholemia, las concentraciones de EtG en sangre, orina y pelo, y el diagnóstico hepático (hepatopatías). Valorando estas relaciones se puede predecir si el individuo era bebedor abusivo de alcohol.

Para verificar la hipótesis, la presente Tesis tiene como Objetivo principal comprobar que en cadáveres judiciales del Instituto Anatómico Forense de Madrid, la relación entre alcoholemia, niveles de etilglucurónido en sangre y orina, y el diagnóstico hepático, permite la valoración forense del consumo agudo de alcohol. Y que la relación entre etilglucurónido en pelo y el diagnóstico hepático, permite la valoración forense del consumo crónico de alcohol. De esta forma, para realizar el objetivo principal se han planteado objetivos específicos.

El primer objetivo específico procura Valorar el consumo agudo de alcohol utilizando la alcoholemia, cuantificada por cromatografía de gases con un detector de ionización de la llama y acoplado a un automuestreador de espacio en cabeza.

El segundo, valorar el consumo agudo o crónico de alcohol utilizando los niveles de etilglucurónido en sangre, orina y pelo, tras su determinación por cromatografía líquida acoplado a un detector de masas en tándem.

Como tercer objetivo específico, se plantea analizar las relaciones entre alcoholemia y etilglucurónido en sangre, orina y pelo como estrategia para la valoración del consumo agudo o crónico de alcohol.

Tenemos como cuarto objetivo específico relacionar alcoholemia y EtG con las circunstancias de la muerte para aumentar los criterios de la valoración del consumo de alcohol.

Finalmente, se pretende analizar en el quinto objetivo específico las relaciones entre alcoholemia, niveles de etilglucurónido y diagnóstico hepático como estrategia para diferenciar el consumo agudo del consumo crónico de alcohol.

Desde el punto de vista metodológico, la población (N=208) estuvo formado por los casos o autopsias judiciales donde las circunstancias de la muerte se relacionaron con el consumo de bebidas alcohólicas. Todos los casos autopsiados en el IAF-Madrid, entre diciembre del 2010 y febrero del 2013. La muestra (n=73) estuvo formado por los casos cuyas muestras forenses permitieron evaluar la relación entre la cantidad de EtG, la alcoholemia y el diagnóstico histopatológico del individuo.

Así, a partir de los 73 casos, se trabajó con la siguiente cantidad de muestras forenses: 73 muestras de orina, 60 muestras de pelo, 37 muestras de hígado y 76

---

muestras de sangre. En el caso de las muestras de sangre, de los 71 casos mencionados se identificaron 5 casos especiales. Estos casos fueron especiales porque durante cada autopsia judicial, se recomendó la recogida de sangre de la zona cardiaca (C) y de la zona encefálica (E).

Por un lado, la determinación de la alcoholemia se realizó en 76 muestras de sangre. Cada muestra fue analizada por duplicado y se utilizó un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama y acoplado a un auto-muestreador de espacio en cabeza. Por otro lado, la determinación de EtG se realizó en 76 muestras de sangre, 73 muestras de orina y en 60 muestras de pelo. La técnica analítica utilizada fue la cromatografía líquida acoplada a un detector de masas en tándem.

Ya el diagnóstico hepatológico se realizó de la siguiente manera: 5 muestras de hígado en el laboratorio de anatomía patológica del IAF – Madrid y 36 muestras de hígado en el laboratorio de anatomía patológica en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Considerando el análisis estadístico, este se realizó con el programa estadístico IBM<sup>®</sup> SPSS 22. Las variables cualitativas fueron: sexo, edad, etiología, recogida, dependencia y diagnóstico. Las variables cuantitativas fueron: etanol en sangre, acetaldehído en sangre, etilglucurónido en orina, etilglucurónido en sangre y etilglucurónido en pelo. Se realizaron análisis bivariantes y multivariantes.

La mínima cantidad cuantificada de etanol en sangre fue 0,0659 g/L y la máxima alcoholemia cuantificada fue 4,3896 g/L. Eliminando los 2 casos donde no se pudo recoger muestra de sangre, 24 casos fueron positivos y 47 casos, no se pudo identificar la presencia de etanol.

Por otro lado, 40 muestras de sangre son positivas para aldehído y 36 muestras fueron negativas. La mínima cantidad cuantificada de acetaldehído fue 0,0001g/L y la máxima concentración detectada fue 0,0486 g/L.

Para EtG en orina el límite de cuantificación fue 0,3255 µg/mL y la concentración máxima detectada fue 181,7242µg/mL.

En 40 casos se obtuvieron resultados negativos para etilglucurónido en sangre y 34 casos fueron positivos. El límite de cuantificación fue 0,0626 µg/mL de EtG en sangre y la concentración máxima detectada fue 4,6306 µg/mL.

Ya en 26 casos, se obtuvieron resultados positivos para etilglucurónido en pelo y en 34 casos negativos. El límite de cuantificación fue 0,0665 µg/mg de EtG en pelo y la máxima concentración detectada fue 8,4210µg/mg.

---

De las 32 muestras con hepatopatía relacionada con el consumo de alcohol, 12 se relacionaron con un esteatosis, 11 con una hepatitis y 9 con una cirrosis.

Considerando los resultados estadísticos, en la presente Tesis varios resultados obtenidos han sido estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ). Los resultados estadísticamente significativos han sido: la correlación entre los datos de etanol y de acetaldehído en sangre; la correlación no paramétrica entre los datos de EtG en sangre y etanol en sangre; la correlación no paramétrica entre los datos de EtG en orina y etanol en sangre; la correlación no paramétrica entre los datos de EtG en pelo y etanol en sangre; la correlación no paramétrica entre los datos de EtG en las muestras forense y acetaldehído en sangre también ha sido estadísticamente significativa.

Por otro lado, la media de las varianzas de etanol en sangre y EtG en sangre, son estadísticamente comparables, así como, el análisis entre los datos de esteatosis y EtG orina generan correlaciones con significancia y confianza.

Se verificó que la relación lineal entre EtOH sangre y EtG sangre exhibe una significancia estadística.

Finalmente, se pueden predecir relaciones entre etanol en sangre, EtG en sangre y hepatopatía.

Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis, se ha podido obtener las conclusiones que se detallan seguidamente:

Los resultados de alcoholemia en cadáveres judiciales del Instituto Anatómico Forense de Madrid, permiten la valoración de la ingesta reciente de alcohol.

En segundo lugar, la presencia de etilglucurónido en sangre, niveles elevados de etilglucurónido en orina y circunstancias de la muerte, son herramientas para la valoración forense del consumo abusivo y agudo de alcohol, cuando el caso se analiza de forma individual.

También se confirma la presencia de etilglucurónido en pelo como marcador para la valoración forense del consumo crónico de alcohol en cadáveres del Instituto Anatómico Forense de Madrid. Por otro lado, la relación entre etanol en sangre y etilglucurónido en sangre, es la mejor estrategia para la valoración del consumo agudo de alcohol en cadáveres del Instituto Anatómico Forense de Madrid.

La valoración forense del consumo de alcohol relacionando las circunstancias de la muerte y los resultados de etanol y etilglucurónido es factible cuando el análisis se realiza de forma individual. Por otro lado, la valoración forense del consumo de alcohol



---

relacionando las circunstancias de la muerte y los resultados de etanol y etilglucurónido es factible cuando el análisis se realiza de forma individual.

También se ha podido concluir que analizar las relaciones entre alcoholemia, niveles de etilglucurónido y diagnóstico hepático es una estrategia para diferenciar el consumo agudo del consumo crónico de alcohol.

La valoración forense, en cadáveres, del consumo agudo de alcohol relacionando etanol en sangre, etilglucurónido en sangre y diagnóstico hepático se puede realizar de forma individual por caso.

La valoración forense del consumo de crónico de alcohol por la presencia de etilglucurónido en pelo, se confirma con la presencia de hepatopatías en cada caso.

La relación entre los niveles de etilglucurónido en orina y la presencia de esteatosis hepática, con un nivel de significación ( $\alpha=0,05$ ), es una estrategia importante para la valoración forense del consumo abusivo de alcohol en cadáveres.

Por otro lado, una alcoholemia positiva y etilglucurónido en sangre dentro del rango (0,4512  $\mu\text{g/mL}$  y 2,1143  $\mu\text{g/mL}$ ), permiten predecir la existencia de hepatopatías alcohólicas en cadáveres con una importante probabilidad estadística.

Comprobar que el consumo abusivo de alcohol se puede diferenciar entre agudo o crónico, relacionando alcoholemia, niveles de etilglucurónido y el diagnóstico hepático, en muestras forenses del Instituto Anatómico Forense de Madrid.

Se ha concluido también que en cadáveres judiciales, el consumo abusivo de alcohol es agudo cuando la alcoholemia es positiva, el etilglucurónido en sangre es positivo y los niveles de etilglucurónido en orina son elevados.

Se confirma que el consumo abusivo de alcohol es crónico cuando etilglucurónido en pelo es positivo en los primeros 3 cm proximales y se confirma con un diagnóstico histopatológico en cadáveres del Instituto Anatómico Forense de Madrid.

El consumo abusivo de alcohol se confirma cuando en el cadáver los resultados analíticos son positivos para alcoholemia y metabolitos del etanol.

La valoración forense, en cadáveres, del consumo abusivo de alcohol queda confirmada cuando alcoholemia, acetaldehído en sangre y etilglucurónido en sangre, orina y pelo son positivas.

Cuando alguno de los ensayos analíticos es negativo, incluir el análisis de las circunstancias de la muerte es una correcta estrategia para mejorar la valoración forense de consumo de alcohol en cadáveres.

---

# Abstract

Relationship between alcohol blood level, ethyl glucuronide and liver disease in cadavers of the Instituto Anatómico Forense de Madrid, and its forensic utility in the assessment of alcohol consumption.

Nowadays, the alcohol (ethanol, EtOH) abuse, by ingestion of alcoholic beverages, is a social, familial, clinical, psychopathological, and traffic serious risk generator.

The *Management of Substance Abuse Team* from the Mental Health and Substance Abuse Department of the World Health Organization (WHO) identifies the abuse of alcohol as a target for public health and calls it "*the harmful use of alcohol*". In 2011, the WHO published "*The Global status report on alcohol and health* ", which confirmed that the "the harmful use of alcohol" is a disease, violence, injury and death causing factor.

Furthermore, it is considered that the abusive ethanol ingesting is related with the excessive consumption of regulated alcoholic beverage. All of the dangerous actions committed under the ethanol consumption influence have a deep significance in the legal and forensic medical field, since it produces specific legal responses in different areas of the Law, such as criminal responsibility, civil capacity or the children custody. Indeed, the dangers of alcohol ingestion could be intensified by other situations, being important to distinguish an acute from a chronic intake, in order to take preventive measures when facing situations that arise from the excessive alcohol consumption.

During the acute, and then chronical alcohol consumption, there are several physiological changes in the ethanol consumer, which can led to an alcohol dependence (alcoholism). Such circumstance has a significant legal importance, which several times may also affect the drinker environment and society.

Accordingly to this, it is essential to define a protocol for the diagnosis of the EtOH ingesting in order to identify the kind of drinker with the pathological consumption. Trying to prevent actions that could be against stablished laws and legal regulations. An appropriate procedure to identify EtOH consumption would be the acute and chronic EtOH markers quantification, relating these results with the hepatic pathology diagnosis. Such investigation should also include the use of samples that

---

allow performing a retrospective evaluation, determining EtOH consumption along a considerable period of time.

When considering the consumption of alcoholic beverages, the most important route is the oral absorption. Of the total of EtOH ingested, 70% is absorbed by the intestines, and then distributed through all of the body systems. During this distribution anabolism and catabolism of EtOH occur, producing distinct metabolites. Theoretically, the blood alcohol level determination will measure the amount of ethanol distributed by the blood at the time of sample collection. At the time when metabolism is no longer working, 95% of the initial EtOH can be eliminated as a metabolite, and a 3% can also be discarded as non-metabolized ethanol. All of the remaining ethanol could be accumulated in the body.

Furthermore, when it is necessary to measure the blood alcohol level, it is important to quantify the amount of EtOH that circulates in the blood, as well as, it is also recommended that the analytical methodology to be used should be undertaken by a headspace autosampler (or Head Space) as a method for EtOH extraction in biological samples.

Therefore, the EtOH quantification can be performed in different biological samples, such as blood, urine, breath, saliva, *vitreous humor* or other samples. Each sample has its advantages and disadvantages, including the concentration of the marker that is quantified in this sample, the analytical method to be implemented, how to treat such sample or the estimation to be performed with the results obtained by the analysis of a particular sample.

An EtOH analytical marker could be described as a chemical compound that will be quantified in order to verify the EtOH intake, as well as, to evaluate the circumstances occurred during the alcoholic intoxication in a transgressive act, an administrative or in a labor process. Indeed, there are several types of markers, indirect and direct markers. In the present investigation, we focus on the study of one of the direct markers of alcohol consumption, the ethyl glucuronide (EtG).

The biosynthesis of the EtG occurs in the liver. When the EtOH concentration reaches a high level, it is combined by a process of anabolism with the glucuronic acid. It is particularly important to relate the EtG level in the human body with the type of consumption. In fact, almost 95% of the absorbed EtOH is biotransformed into acetaldehyde, and from the EtOH remaining, a small fraction can be conjugated with glucuronic acid to form EtG. Such small intake can be increased by excessive alcohol

---

consumption amplifying the amount of EtG, being detectable in instrumental equipment with high sensitivity.

In this work, the hypothesis consists in that in post-mortem samples it is possible to relate: the alcohol level, the EtG concentrations in blood, urine and hair, and liver diagnosis (hepatic pathology). By the evaluation of such relations it can be predicted if the individual was an abusive drinker.

To test the hypothesis, the main objective of this Thesis is to verify that in corpses from the Instituto Anatómico Forense de Madrid (IAF-Madrid), the relationship between alcohol concentration, EtG levels in blood and urine, and liver diagnosis allows the forensic evaluation and identification chronic alcohol ingest. Thus, to achieve the main objective, specific points are purposed.

The first point is focused on the evaluation of the acute alcohol consumption, using the alcohol blood level, being quantified by gas chromatography with a flame ionization detector flame and coupled to a headspace autosampler.

The second point intends to evaluate the acute or chronic alcohol consumption using EtG levels in blood, urine and hair, after determination by liquid chromatography coupled to tandem mass detector.

As a third specific point, it is proposed to analyze the association between alcohol blood level and the EtG blood, urine and hair concentration, as a strategy for assessment of acute or chronic alcohol consumption.

The fourth specific point intends to relate the alcohol blood level and the EtG concentration with the death circumstances, in order to increase the valuation criteria of alcohol ingest level.

Finally, as a fifth specific point, it is intended to analyze the association between blood alcohol levels, EtG concentration, and hepatic (pathological) diagnosis as a strategy to differentiate acute from chronic alcohol consumption.

Considering the methodology, the population ( $N = 208$ ) was composed by the judicial cases or autopsies where the circumstances of the death were associated with the consumption of alcoholic beverages, taking into account all cases autopsied in the IAF-Madrid, between December 2010 and February 2013. The sample ( $n = 73$ ) consisted on those cases whose forensic samples allowed us to evaluate the proportion of EtG, the EtOH blood level, as well as the hepatic pathology diagnosis of the individual.

---

From the 73 cases, we worked with the following number of forensic samples: 73 urine samples, 60 samples of hair, 37 liver samples and 76 blood samples. In the case of blood samples, five from the 71 mentioned were considered special. These cases were distinct for the reason that for each judicial autopsy, it was recommended the blood sampling from two different areas: from the heart (C) and from the brain (E).

The determination of the alcohol blood level was performed in 76 blood samples. Each sample was analyzed in duplicate and a gas chromatograph was used with a flame ionization detector and coupled to an autosampler headspace. On the other hand, the EtG blood concentration was performed in 76 blood samples; in 73 urine samples and in 60 hair samples. The analytical technique used was liquid chromatography coupled to tandem mass detector.

The hepatic pathology diagnosis was made as follows: 5 liver samples in the IAF - Madrid anatomical pathology laboratory, and 36 liver samples in the anatomical pathology laboratory of the Clinical Hospital San Carlos de Madrid.

Statistical analysis was performed using SPSS statistical software IBM©22. It was considered two types of variables. Qualitative variables were: sex, age, etiology, collection, the addiction information, and other previous diagnosis. On the other hand, the quantitative variables were: blood ethanol, acetaldehyde in blood, and EtG in blood, urine, and hair. Bivariate and multivariate analyzes were performed.

Regarding the obtained results in the present Thesis, it was observed that the minimum concentration quantified of ethanol in blood was 0.0659 g/L and the maximum alcohol in blood content was quantified 4.3896 g/L. Removing the two cases where it was not possible to collect blood samples, it was obtained a positive result for 24 cases, and in the other hand, in 47 cases it was not identified the presence of ethanol.

Secondly, it was obtained a positive result for the presence of aldehyde in 40 blood samples, and aldehyde absence for and 36 samples. The minimum acetaldehyde concentration quantified was about 0,0001g/L, and the maximum concentration detected was about 0.0486 g/L.

Considering the analysis of EtG in urine, the lowest concentration achieved was 0.3255 mg/mL and maximum concentration detected was 181,7242µg/mL.

---

Then, in 40 cases it was not detected any presence of EtG in blood, but in 34 cases such presence was identified. Effectively, the lowest level was about 0.0626 mg/ mL of blood EtG and maximum detected was 4.6306 mg /mL.

Regarding the hair samples, EtG was detected in 26 samples, and negative results were achieved in 34 cases. The limit of quantitation was about 0.0665 mg/mg, and the maximum concentration detected was about 8,4210 µg / mg.

Finally, of the 32 samples diagnosed with hepatic pathology related to alcohol abuse, 12 were associated with steatosis, 11 with hepatitis and 9 with cirrhosis.

Considering the statistical results, in the present investigation there were several results that were statistically significant ( $p < 0,001$ ). Namely, the correlation between the blood EtOH concentration and the presence of acetaldehyde in blood; the non-parametric correlation between the EtG blood concentration and EtOH blood concentration; the non-parametric correlation between the EtG concentration in urine, as well as in hair, and the EtOH blood concentration; and, finally, the non-parametric correlation between the presence of EtG in the forensic samples and the presence of acetaldehyde in blood. Finally, it is also important to notice that the average of the variances of EtOH and the concentration of EtG in blood is statistically comparable.

On the other hand, the analysis of the generated data between the steatosis diagnosis and the presence of EtG in urine generate correlations with significance and confidence.

Additionally, the linear relationship between the presence of EtOH in blood and the EtG blood concentration has a statistical significance.

Effectively, it could be predicted a relation between the presence of EtOH in blood, the concentration of EtG in blood and hepatic pathologies.

The present investigation allowed us to make important conclusions, which will be now exposed as follows.

The results of alcohol blood levels in judicial bodies of the IAF-Madrid, allow the assessment of recent alcohol intake;

Secondly, the EtG presence in blood, elevated EtG concentrations in urine and the circumstances of death are forensic tools for assessment of acute alcohol abuse and consumption, when the case is analyzed individually.

The presence of EtG is confirmed in hair as a marker for forensic assessment of chronic alcohol consumption on cadavers from the Forensic Anatomical Institute of Madrid.

---

The relationship between ethanol in blood and EtG blood concentration, is the best strategy for the assessment of acute alcohol consumption on cadavers from the Forensic Anatomical Institute of Madrid.

The forensic assessment of alcohol consumption relating the circumstances of the death and the results of ethanol and EtG is feasible when the analysis is done individually.

To analyze the relationship between blood alcohol levels, the concentration of EtG in blood and hepatic pathological diagnosis is a strategy to differentiate acute chronic consumption of alcohol.

The forensic assessment, in cadavers, of acute alcohol consumption relating ethanol in blood, EtG concentration in blood and hepatic pathological diagnosis can be made individually by case.

Forensic evaluation of chronic alcohol consumption by the presence of EtG in hair, is confirmed by the presence of liver disease in each case.

The relationship between EtG levels in urine and the presence of hepatic steatosis, with a significance level ( $\alpha = 0.05$ ), is an important forensic assessment of alcohol abuse on cadavers strategy.

The presence of EtG in blood within the range concentration of (0.4512 mg / mL and 2.1143 mg / mL), can predict the existence of alcoholic liver disease in bodies with significant statistical probability.

It was also verified that alcohol abuse can be differentiated between acute or chronic, relating blood alcohol levels, concentration of EtG and liver diagnosis, in forensic samples of the Forensic Anatomical Institute of Madrid.

In judicial bodies, the alcohol abuse is acute when the presence of alcohol is positive, the presence of EtG is also positive and levels of EtG IN urine are high.

It is confirmed that the abuse of alcohol is chronic when the concentration of EtG in hair is positive in the first 3 cm proximal, and it was also confirmed with a histopathological diagnosis of the Forensic Anatomical Institute corpses of Madrid.

The alcohol abuse is confirmed when the corpses analytical results are positive for metabolites of alcohol and blood ethanol levels.

The forensic assessment, in cadavers, of the abuse of alcohol is confirmed when alcohol blood levels, acetaldehyde in blood, EtG in blood, in urine and in hair are positive.

---

Finally, it was concluded that when any of the analytical testing is negative, include an analysis of the circumstances of death is a correct strategy to improve the forensic assessment of alcohol consumption on cadavers.





---

# INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES.
2. ALCOHOL.
3. CONSUMO Y DEPENDENCIA DEL ETANOL.
4. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL CONSUMO DE ALCOHOL.
5. METABOLISMO DEL ETANOL.
6. ETILGLUCURONIDO.

---

# INTRODUCCIÓN.

## 1. ANTECEDENTES.

El consumo abusivo de alcohol (etanol), por la ingesta de bebidas alcohólicas, es en la actualidad generador de riesgos en el ámbito social, familiar, clínico, psicopatológico y para el tráfico vial.

El *Management of Substance Abuse Team* (MSB) del Departamento de Salud Mental y Sustancias de Abuso (*Department of Mental Health and Substance Abuse*, MSD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), identifica al consumo abusivo de alcohol como objetivo para la Salud Pública y lo denomina “*the harmful use of alcohol*” o “uso perjudicial o nocivo del alcohol” <sup>(1)</sup>.

En 2010, los 193 estados miembros de la OMS aprobaron una resolución para generar una estrategia para reducir el uso perjudicial o nocivo del alcohol y así reducir todas las consecuencias que se producen. Algunos de estos estados miembros reconocieron que los pasos a seguir, debían incluirse programas preventivos policiales para evitar la conducción y todos los problemas ocasionados, tras la ingesta de alcohol.

En el 2011, la OMS publicó “*The Global status report on alcohol and health*” (GSRAH), donde se confirmó que el “uso perjudicial o nocivo del alcohol” es factor generador de: enfermedades, violencia, lesiones y muerte. En esta publicación se ofrece información detallada sobre:

- a. Perspectiva del consumo de alcohol (global, regional y por países).
- b. Patrones o formas de consumo.
- c. Consecuencias para la salud.
- d. Consecuencias sociales.
- e. Respuesta policial en estados miembros.

Para comprender la importancia de este trabajo, no se puede dejar de indicar que la OMS describe al “consumo de riesgo y perjudicial o nocivo de alcohol” como factor causante de ciertas patologías o enfermedades como:

- 
- a. Dependencia alcohólica.
  - b. Epilepsia.
  - c. Cirrosis hepática.
  - d. Pancreatitis.
  - e. Isquemia cardíaca.
  - f. Cáncer al hígado.
  - g. Cáncer al colon.
  - h. Cáncer en diferentes zonas de la cavidad oro faríngea.
  - i. Diabetes *mellitus*.
  - j. Alteraciones del desarrollo fetal.
  - k. Síndrome alcohólico fetal.

A consecuencia del uso perjudicial o nocivo de alcohol se producen 2,5 millones de muertes al año, aproximadamente el 4% de todas las formas de muerte están atribuidas al alcohol. El alcohol es el principal factor responsable de 60 tipos de muertes y/o lesiones, además es uno de los factores relacionados con otros 200 tipos de muerte. Su uso perjudicial o nocivo del alcohol es el tercer factor de riesgo de muertes prematuras y discapacidad en el mundo <sup>(2)</sup>.

Como hemos mencionado, el consumo de etanol está relacionado con la ingesta de bebidas alcohólicas, por lo que no se consideran las intoxicaciones, los trastornos a la salud o las muertes producidas tras el consumo de bebidas ilegales o adulteradas.

La Unión Europea en su reglamento CE N° 110/2008 <sup>(3,4)</sup> denomina “bebida espirituosa” a la bebida alcohólica que cumple con los siguientes características:

- a. Son producidas para el consumo humano.
- b. Tienen cualidades organolépticas que ayudan a clasificarlas.
- c. Un grado de alcohol mínimo.
- d. El alcohol se pueden obtener por:
  - Fermentación alcohólica natural y destilación de etanol.
  - Maceración de materias primas vegetales con etanol.
  - Adición reglamentada de etanol.
  - Mezcla de diferentes bebidas espirituosas.

---

De lo anterior se concluye que el consumo abusivo <sup>(5)</sup> de etanol, es el consumo excesivo del alcohol proveniente de una bebida alcohólica reglamentada, por ejemplo una “bebida espirituosa”.

Con referencia al consumo de alcohol, la OMS indicó en el 2005 que el consumo promedio a nivel mundial, se podía estimar en 6,13 litros (L) de etanol puro por persona mayor de 15 años; de este valor se destaca que 1,76 L (28,6%) está relacionado con el consumo de bebidas domésticas, por producción casera, o ilegales.

A nivel global, entre los años 1990 y 2005, la media de consumo fue estable con un rango entre 4,3 y 4,7 L de alcohol puro <sup>(2)</sup>.

Después de analizar la situación general del consumo de alcohol, la OMS generó una conclusión importante, que a nivel mundial el consumo es mucho menor en las regiones más pobres del planeta y en las regiones con creencias muy estrictas.

Para desarrollar este análisis, se estimó el consumo por año de bebida alcohólica legal en el adulto per cápita (CAP) o persona mayor de 15 años, durante el 2003 y el 2005, y con una distribución en regiones mundiales <sup>(2)</sup>. Se hizo hincapié en diferenciar cuando el consumo era de bebidas alcohólicas legales, si era de bebidas alcohólicas domésticas o ilegales y si el consumo era por parte de turistas.

En el análisis de la OMS, la región Europa tuvo un valor medio CAP de 12,18 L. El valor medio CAP de algunos países europeos fueron: 12,45 L para Portugal, 10,22 L para España, 13,30 L para Francia, 11,81 L para Alemania y 9,55 L para Polonia <sup>(2)</sup>.

En la región americana el valor medio CAP fue de 8,67 L y se identificó una gran variabilidad entre países, por ejemplo en los Estados Unidos de Norteamérica fue de 8,44 L, en México fue de 5,02 L, en Brasil fue de 6,16 L, en Colombia fue de 4,17 L, en Perú fue de 2,90 L y en Argentina fue de 8,00 L <sup>(2)</sup>.

En la región África, el valor medio CAP fue de 6,15 L. En esta región la variabilidad es resaltante, así tenemos que muchos países tuvieron un valor medio CAP inferior a 2,5 L, mientras que el valor en Nigeria fue de 9,78 L <sup>(2)</sup>.

---

Con los resultados descritos y con los de otras regiones <sup>(2)</sup>, se confirman 2 ideas importantes:

- a. Cuando, en una región o país, el consumo de bebidas alcohólicas legales es bajo, hay una gran probabilidad que el consumo de bebidas alcohólicas ilegales sea alto.
- b. El consumo de bebidas alcohólicas legales tiene más relevancia en países desarrollados, mientras que en los países en vías del desarrollo, el consumo de bebidas alcohólicas ilegales es más frecuente.

Al analizar el problema que conlleva el consumo de bebidas alcohólicas, no se puede dejar de lado la frase “estrato socio-económico del individuo”. Esta frase implica otros detalles grupales e individuales que pueden favorecer al consumo abusivo de etanol, un ejemplo claro es la dedicación al consumo de bebidas alcohólicas como solución ante problemas personales, familiares y económicos.

Se puede afirmar por todo lo informado hasta el momento, que las bebidas alcohólicas existen a nivel mundial, que su consumo existió, sigue y seguirá existiendo; también se puede afirmar que la edad de iniciación en el consumo de alcohol se está reduciendo, la OMS valoró a bebedores primerizos entre los 13 y 15 años con resultados que tienen diferentes valores según su región global.

No se puede dejar de mencionar que el consumo abusivo de etanol tiene una relación directa con la situación socio-económica individual y global o regional de la población.

Cuando se menciona la situación individual de la población, se hace referencia al estrato socio-económico al que pertenece un individuo. Esto implica algunos detalles como: tipos y cantidades de bebidas consumidas, calidad de las bebidas consumidas o costumbres y creencias para el consumo de las bebidas alcohólicas.

Cuando se menciona la situación socio-económica global o regional, se hace referencia a la industria de bebidas alcohólicas que moviliza un sector productivo muy importante, sector que influye en el mercado de trabajo y en la población económicamente activa <sup>(6)</sup>.

---

Así, por ejemplo en España, la Federación Española de Bebidas Espirituosas (F.E.B.E.) en su memoria anual de actividades 2011<sup>(7)</sup>, indica textualmente: “La industria de bebidas espirituosas es un importante creador de riqueza y empleo en nuestro país, capaz de generar un volumen de negocio valorado en más de 7.400 millones de euros y crear más de 330.000 puestos de trabajo, directos e indirectos. Este sector en España está compuesto, en un 80%, por negocios familiares, pequeñas empresas y microempresas que compiten en armonía con grandes multinacionales que operan a nivel mundial”.

Por lo tanto, reducir la producción de bebidas alcohólicas y así evitar el consumo abusivo de etanol, no es una opción realista. Las bebidas alcohólicas siempre estarán presentes, como en tiempos pasados, al alcance de los que quieran consumirlas.

Todas las acciones de riesgo que se cometen bajo la influencia del etanol, tienen gran trascendencia en el ámbito médico legal y forense porque producen respuestas jurídicas específicas en los distintos campos del Derecho: la imputabilidad penal, la capacidad civil, la concesión de licencias para conducir, el uso de armas, la guarda y custodia de los hijos y, las condiciones laborales del trabajador. En España, por ejemplo, estos campos están contemplados en el Código Penal, en la Ley sobre Tráfico, Circulación de Vehículos a Motor y Seguridad Vial, en algunos reglamentos laborales. También se describen diferentes acciones, cuando se está bajo la influencia del etanol, en pólizas de seguros.

Después de todo lo indicado, está claro que los riesgos por el consumo de alcohol pueden incrementarse y que es importante diferenciar al bebedor habitual del bebedor excesivo para tomar medidas preventivas frente a diferentes situaciones producidas por la ingesta de las bebidas alcohólicas.

Durante el consumo excesivo y posteriormente crónico, se producen cambios fisiológicos en el bebedor, los cuales pueden finalizar en una dependencia alcohólica. Esta dependencia, conocida como alcoholismo, tiene una trascendencia legal muy importante hasta el grado de involucrar al ambiente y la sociedad que rodean al individuo dependiente.

Asimismo, en el campo de la medicina clínica, la dependencia alcohólica, relaciona la interacción de los fármacos con el etanol y las patologías asociadas frente a los riesgos, individuales o sociales, que se pueden prevenir cuando la dependencia se confirma.

---

Hoy en día el término alcohólico describe al individuo con ciertas características repetitivas en sus hábitos de ingesta de bebidas alcohólicas, pero no diferencia la incapacidad del individuo para metabolizar el alcohol absorbido debido a los cambios bioquímicos y fisiológicos de su organismo.

En la 4ª edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, conocido por las siglas anglosajonas (DSM-IV-TR<sup>®</sup>) se detallan los criterios diagnóstico para el abuso de alcohol y para la dependencia del alcohol, estos criterios se deben aplicar monitoreando un patrón durante un periodo de 12 meses <sup>(8)</sup>. La nueva edición, el DSM-5<sup>®</sup> <sup>(9)</sup> está generando críticas y discusiones porque se propone diferente número de criterios para valorar el abuso, la dependencia, los trastornos por el consumo y la abstinencia <sup>(10)</sup>.

Hasta el momento el poder de discriminación entre el bebedor habitual, el bebedor excesivo, el bebedor crónico o el bebedor dependiente, es muy difícil de diagnosticar utilizando diferente tipo de ensayos. Los ensayos clínicos y los ensayos analíticos de cuantificación de etanol utilizan muestras convencionales que determinan marcadores que pueden existir cuando el consumo se realizó pocas horas antes del análisis.

Además, las consecuencias por el consumo en exceso o abusivo de etanol logran superar las generadas por el consumo de drogas de abuso. Las intoxicaciones, trastornos y patologías que se producen por el etanol, aumentan las probabilidades de generar actos delictivos y hasta criminales.

Por todo lo descrito, es importante la determinación de un protocolo para diagnosticar el consumo de etanol y así poder identificar al individuo con consumo patológico, previniendo acciones que sean contrarias a las leyes y normativas jurídicas.

Un procedimiento correcto para diagnosticar el consumo de etanol, sería la cuantificación de marcadores de su consumo agudo y crónico, relacionar estos resultados con el diagnóstico histopatológico e incluir el uso de muestras que permitan realizar una valoración retrospectiva, determinando el consumo de etanol a lo largo de un período de tiempo determinado.



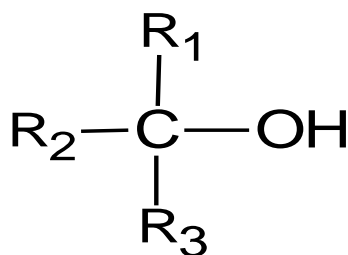
---

Utilizando muestras biológicas recogidas durante autopsias judiciales, permitirá comprobar que el individuo, del que se recogerán las muestras, tiene problemas fisiopatológicos producidos por el consumo de etanol y así, valorar los resultados analíticos realizados.

---

## 2. ALCOHOL.

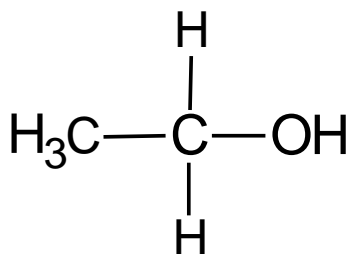
En la naturaleza, existe una gran diversidad de compuestos orgánicos. Estos se diferencian entre sí por la presencia de átomos unidos de forma especial a los diferentes grupos funcionales orgánicos <sup>(11)</sup>, uno de estos grupos funcionales identifica a una familia de compuestos orgánicos llamados alcoholes (Figura 1), proporcionando en estos compuestos muchas propiedades físicas y químicas.



**Figura 1:** Estructura general de los alcoholes.

Cada alcohol tiene propiedades físicas y químicas propias, que los diferencian entre sí y que generan diferentes comportamientos cinéticos y dinámicos en el organismo humano.

En el argot cotidiano, cuando se menciona la palabra alcohol se describe un solo compuesto químico, el etanol (Figura 2), aunque químicamente es todo lo contrario, ya que el término alcohol describe a cualquier molécula orgánica cuyo grupo funcional principal es el oxhidrilo o hidroxilo (-OH).



**Figura 2:** Estructura general del etanol.

Es importante especificar que el alcohol que se consume en las bebidas alcohólicas, es el etanol, alcohol etílico o también llamado alcohol de grano.

---

El alcohol etílico tiene las siguientes características fisicoquímicas principales <sup>(8,12,13)</sup>:

- a. Es un alcohol primario.
- b. Es un líquido incoloro a temperatura ambiente.
- c. Tiene un peso molecular igual a 46,06844 g/mol.
- d. Tiene un punto de fusión igual a -114°C.
- e. Tiene un punto de ebullición igual a 78°C.
- f. Es una molécula polar y extremadamente soluble en agua.
- g. Tiene una constante de equilibrio (Ka) igual a  $10^{-15,5}$ .
- h. Por su tamaño molecular y peso molecular es un compuesto volátil.
- i. Tiene un umbral de olor igual a 84 ppm.
- j. Es altamente inflamable.
- k. Las mezclas vapor/aire pueden ser explosivas.

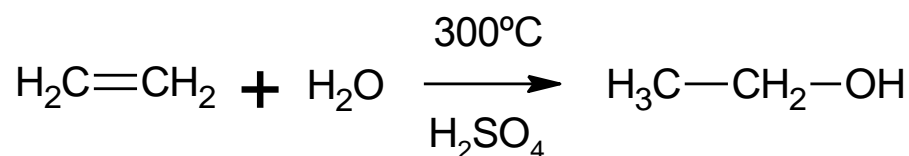
Las principales características toxicológicas relacionadas con el etanol son <sup>(9,14,15,16,17,18,19)</sup>:

- a. Tiene un valor límite de exposición o *Threshold Limit Value* (TLV) igual a 1000 ppm, valor referido a la media ponderada respecto al tiempo o *Time-weighted average* (TWA).
- b. Tiene un valor límite de exposición profesional igual a 1000 ppm, cantidad referida como valor límite ambiental de exposición corta (VLA-EC).
- c. Está clasificado en el grupo 1 para los agentes cancerígenos en humanos, según la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) de la OMS.
- d. La *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (DFG) lo clasificó en el grupo C para los agentes de riesgo para el embarazo, categoría establecida por la *Food and Drugs Administration* (FDA).
- e. Tiene una dosis letal calculada igual a 4g/Kg de peso, con excepción de individuos susceptibles.

El etanol puede ser utilizado con fines industriales como disolvente, germicida, anticongelante o como aditivo de combustibles, entre otras aplicaciones. El etanol industrial se desnaturaliza para evitar su consumo. Esta desnaturalización se realiza utilizando éter de petróleo, éter etílico, alcanfor y colorantes.

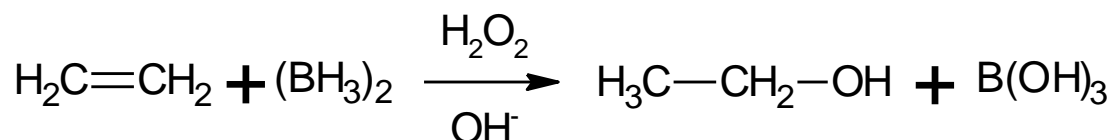
La preparación o síntesis del etanol, a nivel industrial, se logra de las siguientes formas <sup>(9,20,21)</sup>:

- a. Por hidratación del eteno en una reacción de adición utilizando altas temperaturas y ácido sulfúrico como catalizadores.



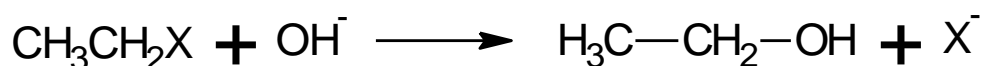
**Figura 3:** Síntesis de etanol por hidratación de eteno.

- b. Por hidroboración del eteno utilizando peróxido de hidrógeno en medio alcalino como catalizador.



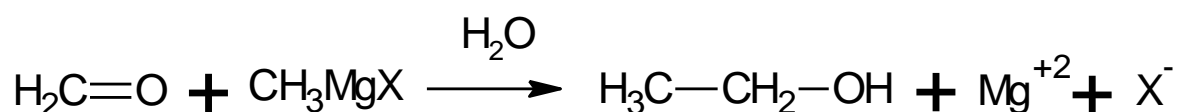
**Figura 4:** Síntesis de etanol por hidroboración de eteno.

- c. Por hidrólisis de halogenuros de etilo en un medio alcalino.



**Figura 5:** Síntesis de etanol por hidrólisis de halogenuros.

- d. Por la reacción de Grignard, entre el formaldehído y un halogenuro de metil-magnesio.



**Figura 6:** Síntesis de etanol con reactivo de Grignard.

---

El etanol también puede ser obtenido durante la producción de las bebidas alcohólicas. Este etanol se obtiene por fermentación alcohólica y es física y químicamente igual al sintetizado para fines industriales.

La fermentación alcohólica es un proceso biológico donde se produce etanol <sup>(22)</sup> como ingrediente activo de una bebida legal específica, llamada bebida alcohólica o bebida espirituosa, que se diferencia de otras por el grado alcohólico y por la materia vegetal utilizada para la fermentación.

La acción de añadir etanol industrial a cualquier bebida alcohólica, produce una bebida alcohólica adulterada y tiene una repercusión legal contra la salud muy importante. El consumo de la bebida adulterada, puede producir intoxicaciones y alteraciones fisiológicas diferentes a las producidas cuando se consume una bebida legal.

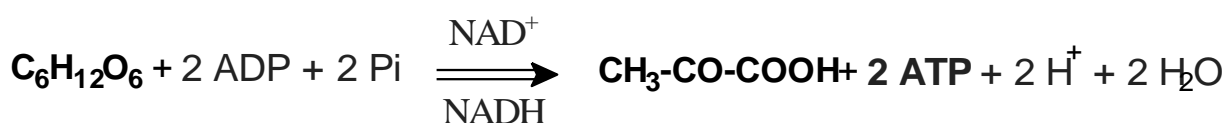
## 2.1 Fermentación alcohólica.

En los organismos vivos, el metabolismo de la glucosa o glicólisis, tiene como finalidad producir adenosina tri-fosfato (ATP) como fuente de energía celular <sup>(23)</sup>.

Esta molécula energética se produce tras una cadena de reacciones, donde las enzimas se oxidan o se reducen, donde las coenzimas facilitan la producción de compuestos y donde los co-factores movilizan electrones entre diferentes grupos funcionales.

La glicólisis se desarrolla en 2 etapas, en la primera etapa la glucosa se transforma en gliceraldehído y en la segunda etapa, se produce ácido pirúvico y 2 moléculas de ATP <sup>(14,24)</sup>.

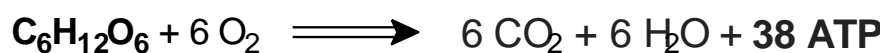
En general, la transformación de glucosa hasta ácido pirúvico se describe en la siguiente reacción bioquímica:



**Figura 7:** Transformación de glucosa hasta ácido pirúvico.

---

Cuando el ácido pirúvico es producido en organismos o sistemas aerobios, será utilizado como sustrato químico para iniciar una cadena de reacciones bioquímicas agrupadas en el ciclo de Krebs y en la fosforilación oxidativa. El conjunto de estas reacciones, es un proceso llamado respiración celular y su balance son 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, como se muestra en la siguiente ecuación general:



**Figura 8:** Balance general de la respiración celular.

Pero cuando el ácido pirúvico es producido en organismos o sistemas anaerobios, se produce un proceso llamado glicolisis anaeróbica para obtener las moléculas de ATP. Este proceso puede producirse de 2 formas: la fermentación láctica y la fermentación alcohólica.

La fermentación láctica se puede producir en varios tipos de microorganismos y en algunas células musculares, el producto principal de este proceso, además de ATP, es el ácido láctico <sup>(25)</sup>.

Cuando el producto obtenido es el etanol, el proceso se llama fermentación alcohólica y se produce en levaduras con 2 características importantes: ser resistentes y tener fuerza de fermentación. Este proceso se describe en la siguiente reacción bioquímica <sup>(14,26)</sup>:



**Figura 9:** Balance general de la fermentación alcohólica.

## **2.2 Producción de bebidas alcohólicas.**

La producción y consumo de bebidas alcohólicas es una de las actividades más antiguas desarrolladas por el hombre <sup>(27)</sup>. Con excepción de países con costumbres sociales y religiosas estrictas, en aquellos países donde existen industrias de producción de bebidas alcohólicas, esta actividad genera fuentes de ingresos a través de los impuestos y diferentes puestos de trabajo.

---

La producción de bebidas alcohólicas finaliza cuando se obtiene un producto líquido de características especiales y con una cantidad de etanol referente al volumen total de la bebida. El etanol obtenido se clasifica como destinado para consumo de boca <sup>(18)</sup> y se puede obtener por la fermentación principalmente de cereales o melazas.

Esta producción se puede clasificar en tres tipos: producción de cerveza, producción de vinos y sus variedades, y la producción de bebidas espirituosas.

### **2.2.1. Producción de cerveza.**

Las formas de producción de cervezas, con diferente grado alcohólico, tienen en común la presencia del género *Saccharomyces*, una levadura que se encarga de la fermentación de diferentes tipos de cereales, la materia prima, con diferentes hidratos de carbono como: sacarosa, glucosa, fructuosa, galactosa, manosa, maltosa o malttriosa <sup>(18,25)</sup>.

Las principales especies de levaduras utilizadas para la producción de cervezas son:

- a. *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada para la producción de cerveza de tipo ALE, caracterizada por su color pálido
- b. *Saccharomyces carlsbergensis*, utilizada para la elaboración de cerveza de tipo LAGER, caracterizada por su color rubio.

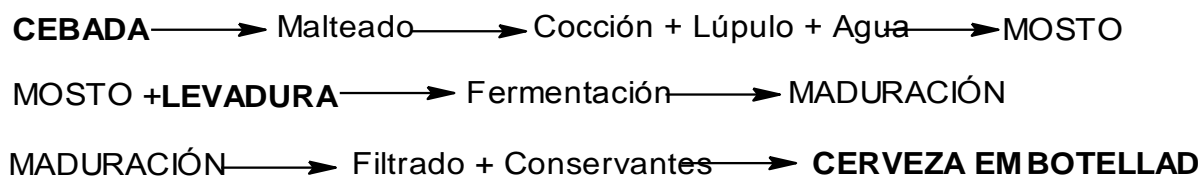
La eficiencia de la producción de cerveza implica un control de calidad sobre las levaduras, buscando la cepa que cumpla las siguientes características: elevada tolerancia al etanol, la capacidad de floculación y resistencia a toxinas <sup>(25)</sup>.

La ruta metabólica de Embden-Meyerhof es responsable de la fermentación alcohólica utilizada para la producción de las cervezas. En este proceso se puede obtener trazas de glicerol y/o acetaldehído, y su desarrollo industrial se realiza en tres partes, que se resumen en el siguiente proceso:



**Figura 10:** Proceso de la fermentación alcohólica.

En general la producción de cerveza tiene varias etapas que finaliza en el embotellado de un líquido con características físicas y químicas, y un grado de alcohólico o porcentaje de etanol propio de una marca comercial específica, como se describe a continuación:



**Figura 11:** Etapas de la producción de cerveza.

En España, según el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, las bebidas con grado alcohólico superior en volumen al 1,2 por 100 deberán incluir la indicación del grado alcohólico volumétrico adquirido.

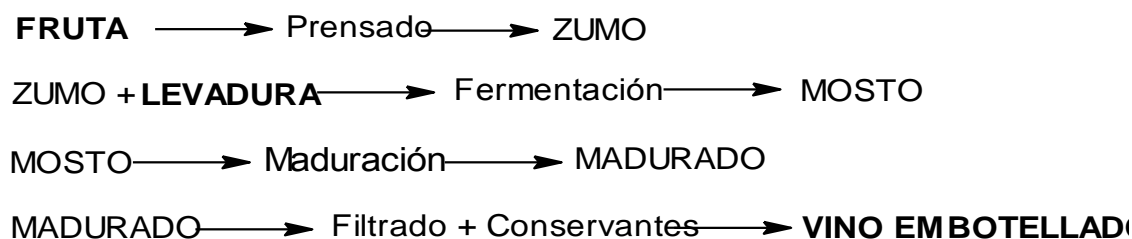
La cifra correspondiente al grado alcohólico debe incluir un decimal como máximo e irá seguida del símbolo “%Vol” y podrá estar precedida de la palabra “alcohol” o de la abreviatura “alc” <sup>(28)</sup>.

### 2.2.2. Producción de vinos y sus variedades.

La producción de vino tiene como materia prima a cualquier fruta, de esta forma se obtienen las diferentes variedades: el vino de uva, el vino espumoso, el jerez y similares, el oporto, la sidra, el sake o el vino de palma <sup>(25, 29)</sup>.

Como se resume a continuación (Figura 12), esta producción tiene sus propias etapas que, como con la cerveza, finaliza con el embotellado de un líquido con características físicas y químicas propias de la marca comercial y con un grado de alcohólico o porcentaje de etanol característico <sup>(18)</sup>:





**Figura 12:** Etapas de la producción de vino.

Los siguientes productos y subproductos, diferentes en los vinos y sus variedades, también pueden ser obtenidos al finalizar esta producción <sup>(25, 27)</sup>:

- 19 tipos de ácidos carboxílicos, siendo los principales: ácido acético, ácido málico y ácido cítrico. Es importante resaltar que se puede obtener concentraciones bajas de ácido glucorónico y ácido glucónico.
- 15 tipos de Esteres, siendo los principales: acetato de etilo y propanoato de etilo.
- 15 tipos de Alcoholes, siendo los principales: metanol, butanol y octanol.
- Compuestos carbonílicos, entre los principales se obtiene: benzaldehído, acetaldehído y compuestos furfúricos.
- Lactonas.
- Compuestos fenólicos.
- Compuestos azufrados.

El Reglamento (UE) N° 251/2014 establece que el grado alcohólico influye en la definición y la clasificación de los productos vitivinícolas aromatizados, por lo que describe los siguientes términos <sup>(30)</sup>:

- “Grado alcohólico volumétrico”, como la relación entre el volumen de alcohol en estado puro, contenido en el producto de que se trate a la temperatura de 20 °C, y el volumen total del mismo producto a la misma temperatura .
- “Grado alcohólico volumétrico adquirido”, como el número de volúmenes de alcohol puro a 20 °C de temperatura, contenidos en 100 volúmenes del producto considerado a dicha temperatura.
- “Grado alcohólico volumétrico en potencia”, como el número de volúmenes de alcohol puro a 20 °C de temperatura que pueden producirse mediante fermentación total de los azúcares contenidos en 100 volúmenes del producto considerable a dicha temperatura.
- “Grado alcohólico volumétrico total”, como la suma de los grados alcohólicos volumétricos adquirido y en potencia.

---

### **2.2.3. Producción de bebidas espirituosas.**

La producción de bebidas destiladas data del año 800 A.C., cuando en China se producía un licor a partir del arroz. También se conoce de este tipo de producción en los primeros años del Imperio Egipcio. Su ingreso a Europa Occidental fue por el norte de África y era una labor que pertenecía a monjes y alquimistas, el producto destilado fue conocido como “agua de la vida” y fue descrito como un nuevo elemento de la naturaleza con propiedades medicinales <sup>(18)</sup>.

Se denomina bebida espirituosa, a toda bebida alcohólica cuyo etanol se produce a partir de la fermentación de líquidos azucarados y que después de diferentes procesos, se obtiene un líquido con un grado alcohólico, y características físicas y químicas propias de la marca comercial <sup>(5)</sup>.

Las bebidas espirituosas se producen directamente mediante la destilación, la maceración o la adición de aromas, bien por mezcla de una bebida espirituosa con otra bebida, con alcohol etílico de origen agrícola o con determinados destilados.

En general podemos clasificar a las bebidas espirituosas en:

- a. Congenéricas, cuando el destilado tiene un aroma específico con la materia prima utilizada en la fermentación, como el brandy, el whisky o el ron.
- b. No congenéricas, cuando la materia prima es inespecífica, y se utilizó una solución alcohólica para la fermentación y destilación, como la ginebra, el vodka o el aguardiente.

En el Reglamento (CE) 110/2008 de la Unión Europea se indica: “serán las bebidas alcohólicas destinadas al consumo humano, con cualidades organolépticas particulares y podrá tener un grado alcohólico mínimo de 15,0% vol” <sup>(3)</sup>.

### **2.3. Determinación de etanol.**

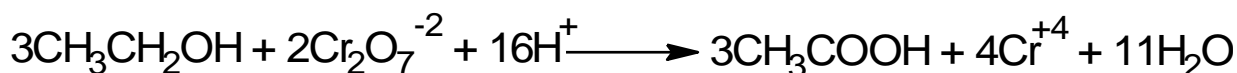
La determinación de etanol se fundamenta en aprovechar sus propiedades físicas o químicas para identificarlo y para conocer su cantidad en una muestra específica. Según la muestra, este proceso analítico se puede realizar de diferentes formas.

---

Si la muestra es una bebida alcohólica, la determinación de etanol es parte del control de calidad del producto elaborado. Es importante indicar que primero se realiza una extracción destilando una cantidad de bebida alcohólica, por lo que la muestra que se analiza durante este proceso analítico, es un destilado o solución hidroalcohólica.

Para medir la cantidad de etanol en la muestra destilada, se puede proceder de las siguientes formas <sup>(21,22,24,31,32,33,34)</sup>.

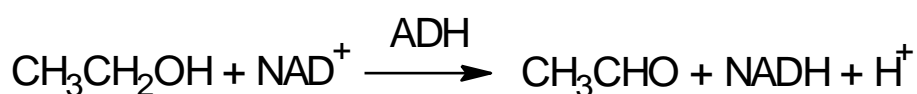
- a. Medición de la densidad de la bebida alcohólica utilizando un hidrómetro.-  
Esta medición se fundamenta en conocer la densidad o peso específico de la muestra y relacionarlo con la masa de etanol en la solución hidroalcohólica. El resultado se expresa como porcentaje o grado Gay Lussac (°GL), utilizando tablas y controlando los parámetros analíticos durante el análisis.
- b. Medición de la densidad de la bebida alcohólica utilizando un alcoholímetro.-  
Esta medición tiene el mismo fundamento que al utilizar el hidrómetro, la diferencia es que no es necesario utilizar las tablas porque el resultado expresa como el contenido de etanol.
- c. Medición de la densidad de la bebida alcohólica utilizando un picnómetro.-  
Esta medición se fundamenta en conocer el peso de la muestra utilizando el picnómetro. Cuando el picnómetro está lleno con la muestra, este sistema se pesa y se calcula la masa por unidad de volumen.
- d. Medición del punto de ebullición de la bebida alcohólica.-  
Esta medición se fundamenta en el cambio del punto de ebullición de la muestra destilada con referencia a una muestra blanco. La diferencia en el punto de ebullición es proporcional a la cantidad etanol.
- e. Medición por el método de óxido – reducción con dicromato de potasio.-  
Esta medición se fundamenta en la reacción (Figura 13) entre el etanol y dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) en medio ácido, la cantidad de  $K_2Cr_2O_7$  sin reaccionar se relaciona con la cantidad de etanol. El reactante en exceso se puede valorar con una solución de sulfato ferroso y amonio o midiendo el cambio de coloración, de naranja a verde, con un instrumento espectrofotométrico, utilizando una muestra blanco como referencia.



**Figura 13:** Reacción entre el etanol y el dicromato.

f. Medición por el método enzimático.-

Este método se fundamenta en la oxidación del etanol hasta acetaldehído, utilizando la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), y la coenzima dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidada ( $\text{NAD}^+$ ) (Figura 14). La relación entre  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$  se mide utilizando un instrumento espectrofotométrico para relacionarlo con la cantidad de etanol.



**Figura 14:** Reacción enzimática del etanol.

g. Medición por el método cromatográfico.-

Este método se fundamenta en aprovechar la volatilidad del etanol para identificarlo y cuantificarlo en la muestra. La medición se puede realizar en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de la flama (GC/FID) o en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (GC/MS).

Si la muestra es biológica, un biofluido o un tejido, la determinación de etanol se realiza directamente en la muestra, cuidando que el proceso de extracción del etanol, si es necesario, se incluya en el método analítico utilizado.

Para el caso de muestras biológicas, el método analítico recomendado es la cromatografía de gases, instrumento que puede estar acoplado a un detector de ionización de la flama o a un detector de masas, según el motivo por el cual se está desarrollando el análisis.

Cuando se desea conocer la alcoholemia <sup>(35)</sup> de un individuo, es importante cuantificar la cantidad de etanol que circula por la sangre del sujeto y es recomendable que la metodología analítica a utilizar sea la CG/FID <sup>(11,36)</sup>, el análisis mejora si se utiliza un automuestreador de espacio en cabeza o *Head Space* (HS) <sup>(37,38)</sup> como método para la extracción del etanol en la

---

muestra biológica, porque en el HS se aprovecha la volatilidad del analito, el etanol, para separarla de la muestra analítica, la sangre o cualquier muestra biológica.

Otros métodos que también pueden utilizarse son la medición del etanol por el método de óxido – reducción con dicromato de potasio o la medición por el método enzimático, cuyos fundamentos fueron descritos anteriormente.

Cuando la muestra biológica es un volumen de aire espirado, la metodología analítica recomendada se fundamenta en la combinación de la espectrometría infrarroja y el análisis electroquímico. Esta metodología se aplica en los etilómetros actuales, con los que se realiza la determinación de etanol en aire espirado, en España estos equipos deben cumplir un riguroso control metrológico para su correcto funcionamiento<sup>(11,39,40)</sup>.

La determinación de etanol en muestras biológicas, se puede realizar en las siguientes muestras biológicas<sup>(33,41,42,43,44,45,46,47)</sup>:

a. Sangre

Esta es la muestra por excelencia, en ella se cuantifica la cantidad de etanol que se distribuye a los diferentes tejidos y órganos, y porque nos orienta con las alteraciones psíquicas que se pueden estar produciendo en un individuo. El resultado obtenido en esta muestra representa la alcoholemia o cantidad de etanol sin metabolizar en un volumen de sangre entera en un individuo, este valor se puede utilizar para conocer el consumo reciente de bebidas alcohólicas. El análisis de esta muestra se puede realizar en sujetos vivos y en cadáveres.

Existe la posibilidad, como ocurre en los análisis clínicos, de realizar la determinación de etanol en suero o plasma y utilizar un coeficiente para interpretar la alcoholemia; el valor medio del coeficiente para el suero es de 1,15 y para el plasma es de 1,18.

b. Orina

La alcoholuria muestra la cantidad de etanol en un volumen de orina y se relaciona con la cantidad de etanol sin metabolizar, que el individuo está eliminando. La cantidad de etanol en esta muestra está influenciada por la cantidad de bebida alcohólica consumida, por el metabolismo y las patologías del individuo. El análisis de esta muestra se puede realizar en

---

sujetos vivos y en cadáveres, siempre que las condiciones en el sujeto permitan su obtención.

Existe una correspondencia entre la alcoholuria y la alcoholemia de 1,30, esta relación se puede utilizar siempre que se comprenda que el etanol calculado, no está presente en el organismo del individuo.

c. Aire espirado

El aliento con olor a alcohol se fundamenta en que una pequeña proporción del etanol, que se absorbe tras el consumo de bebidas alcohólicas, se elimina por el aire espirado. El etanol que se distribuye por el organismo, también llega a los alveolos pulmonares y, tras un intercambio gaseoso, se elimina por el aire que se espira. Es la principal muestra para determinar la cantidad aproximada de etanol por consumo reciente de bebidas alcohólicas. El coeficiente recomendado, para relacionar la cantidad de etanol en aire espirado y la alcoholemia es de 2100:1.

d. Saliva

Esta muestra puede ser utilizada para relacionar el consumo reciente de bebidas alcohólicas porque la cantidad etanol se mantiene estable entre los 30 minutos y 6 horas posteriores a la ingesta. La utilidad del análisis de esta muestra es para sujetos vivos.

Existe una relación proporcional entre la cantidad de etanol en saliva y la alcoholemia que tiene un valor aproximado de 1,08.

e. Humor vítreo

La utilidad de analizar esta muestra en cadáveres, es que refleja la cantidad de etanol acumulado después del consumo de bebidas alcohólicas. La correlación utilizada entre la cantidad de etanol en humor vítreo y la alcoholemia, debe involucrar la valoración del equilibrio en la distribución del etanol en esta muestra, utilizándose un valor aproximado de 1,145. Cuando se compara el momento inicial de la absorción frente a la eliminación de etanol, las correlaciones son diferentes. La cantidad de etanol en esta muestra, también, tiene una alta estabilidad, por lo que se utiliza para identificar la producción post mórtem de etanol.

---

f. Otras muestras

Existen muestras alternativas que también pueden ser utilizadas para valorar la alcoholemia, así tenemos que la correlación con el hígado es de 0,56, con el líquido cefalorraquídeo es de 1,14, con la bilis es de 0,99, con el músculo esquelético es de 0,94 para alcoholemias superiores a 1g/L y de 1,48 para alcoholemias menores a 1g/L. También existe la posibilidad de utilizar el contenido gástrico, pero el etanol que se determine no está absorbido por el organismo.

---

### 3. CONSUMO Y DEPENDENCIA DEL ETANOL.

Para conocer el impacto que conlleva el consumo y la dependencia del etanol, es importante conocer que la medicalización describe la visión científica que se tiene de los aspectos de la vida humana, diferenciando lo que está bien de lo que está mal, y que es avalado por cifras y estadística. Thomas Szasz y Erving Goffman, indicaron que “medicalización de la desviación” es el término utilizado para describir la desviación del comportamiento normal <sup>(48, 49)</sup>.

El análisis de un comportamiento no normal o conducta desviada tiene dos interpretaciones: la legal, que tiene una implicancia moral, y la científica, que necesita un diagnóstico médico. A lo largo de la historia se propusieron diferentes teorías para relacionar alguna conducta desviada con rasgos físicos o condición física pero todas ellas fracasaron. Lo que sí está aceptado es que hay factores biológicos y genéticos que tienen un impacto modesto sobre la conducta desviada <sup>(22)</sup>.

En general se indica que lo bueno es sano y lo malo es enfermo, y que existen comportamientos malos o enfermos tales como la obesidad, la ludopatía, la adicción a sustancias o el alcoholismo.

Identificar el comportamiento enfermo y los parámetros que describen la enfermedad, será importante porque se tomarán las medidas preventivas para la ayuda especializada de dicha enfermedad y se evitará el rechazo del individuo en la sociedad.

La Real Academia de la Lengua Española (RAE) define el Alcoholismo como “Abuso habitual y compulsivo de bebidas alcohólicas. Enfermedad ocasionada por tal abuso, que puede ser aguda, como la embriaguez, o crónica. Esta última produce trastornos graves y suele transmitir por herencia otras enfermedades, especialmente del sistema nervioso” <sup>(50)</sup>.

En la actualidad, diversos estudios y publicaciones permiten generalizar los límites que existen entre los diferentes bebedores: bebedor social (menos de 60 gramos de etanol puro por día), bebedor de riesgo (entre 60 gramos y 120 gramos de etanol puro por día) y bebedor excesivo (más de 120 gramos de etanol puro por día) <sup>(51)</sup>.



---

Además, la OMS y la *Society of Hair Testing* (SoHT) consideran consumo excesivo superar los 60 gramos de etanol puro por día, durante un tiempo prolongado <sup>(52,53)</sup>.

El *National Institute for Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) considera como consumo excesivo entre 40 gramos y 60 gramos de etanol puro por día para el hombre y entre 30 gramos y 45 gramos de etanol puro por día para la mujer <sup>(50)</sup>.

Sin embargo, reconocer a los diferentes tipos de bebedores anteriormente mencionados, no es el único problema a solucionar, ya que existe otra división entre los bebedores, por lo que es necesario considerar a los bebedores de consumo agudo, los bebedores de consumo crónico y también los bebedores en proceso de abstinencia.

La capacidad de diferenciar entre bebedores, se podría explicar conociendo las cantidades de etanol consumido por día, las costumbres para beber, los hábitos sociales, los problemas psicosociales e inclusive las patologías del individuo.

Conocido el contexto real del consumo y la dependencia del etanol en las bebidas alcohólicas, se puede afirmar que es difícil identificar el tipo de bebedor con tan solo conocer la concentración de etanol en el individuo tras un consumo de bebidas alcohólicas; por tanto es obligatorio un diagnóstico científico, realizado por un especialista, para valorar el tipo de bebedor e identificar si existe un hábito abusivo y por lo tanto, una enfermedad.

### **3.1. Dependencia al etanol.**

Desde el punto de vista del Derecho, la dependencia se define como aquella situación en que un individuo no puede valerse por sí mismo y que se produce por una incapacidad transitoria o permanente, producida por una enfermedad o padecimiento físico o psíquico, que reduce la capacidad laboral del individuo <sup>(54,55)</sup>. En el 2004, la OMS publicó los resultados de un estudio donde se estimó el número de personas, en el mundo, que necesitaban de asistencia diaria de otra persona, para el desempeño de sus tareas personales, domésticas y para el cuidado de su salud <sup>(56)</sup>. La dependencia a sustancias psicoactivas, como lo es el etanol, no fueron consideradas en este estudio.

---

Desde el punto de vista médico y psicológico, la dependencia se define como aquella necesidad compulsiva de consumir una sustancia, para sentir sus efectos o reducir el malestar por su abstinencia<sup>(41)</sup>. En el 2004, la OMS publicó un informe donde se mostraba la importancia de la investigación neurocientífica para el estudio del consumo y de la dependencia de sustancias psicoactivas. Este informe describió a la dependencia a estas sustancias como un trastorno crónico recidivante y que la falta de voluntad para detener el consumo, tenía influencia de aspectos biológicos y genéticos; además reveló que ya en el año 2000, el consumo de etanol era el 4% de la carga de morbilidad relacionada con el consumo de sustancias psicoactivas<sup>(57)</sup>.

La dependencia a sustancias psicoactivas tiene 2 criterios que deben ser estudiados de forma individual, porque implican un proceso biológico y otro psicológico<sup>(30,58,59,60)</sup>:

a. Dependencia física:

Este tipo de dependencia se relaciona con trastornos que el individuo experimenta cuando, durante un tiempo, deja de consumir la sustancia de la que es dependiente.

Según el tipo de sustancia psicoactiva se puede indicar que los trastornos tienen diferente intensidad, así serán muy intensos cuando la dependencia es a depresores, como el etanol, mucho menos intensos para estimulantes, como la cocaína, y poco perceptibles para alucinógenos, como la dietilamida de ácido lisérgico (LSD).

Por lo tanto este tipo de dependencia está relacionada directamente con un cuadro clínico con indicativos físicos y psíquicos, y variable según la sustancia, que se denomina síndrome de abstinencia; pero también con la tolerancia a la sustancia, por lo que la dosis de consumo se incrementará progresivamente para satisfacer el efecto deseado.

b. Dependencia Psíquica:

Este tipo de dependencia se relaciona con el sentimiento de placer o satisfacción por consumir la sustancia psicoactiva. Aquí se incluye la acción de obtener la sustancia y la creencia de no poder realizar ciertas actividades si no están presentes los efectos del psicoactivo, este deseo impulsivo es conocido como “*craving*” o estado de ansiedad.

La relación de satisfacción tras el consumo frente a la aprobación de las actividades realizadas por el medio que rodea al individuo, produce un refuerzo positivo al consumo de la sustancia; mientras que la retirada violenta de la sustancia, puede generar un cuadro clínico que limitará las acciones del sujeto, esto produce un refuerzo negativo al consumo del psicoactivo.

---

En ambos casos, la respuesta inmediata puede ser la ingesta de más sustancia a la que el sujeto es dependiente.

Para diagnosticar la dependencia al etanol se podrá evaluar en el sujeto, los siguientes criterios descritos, en el año 2000, en el DSM-IV-TR<sup>® (6)</sup> y que se indican a continuación:

- a. Tolerancia.
- b. Abstinencia.
- c. Cantidad de etanol consumido en cantidades mayores o durante un periodo más largo de lo que inicialmente se pretendía.
- d. Deseo persistente o esfuerzo infructuoso de controlar o interrumpir el consumo de alcohol.
- e. Emplear mucho tiempo en obtener la sustancia, en consumirla o en la recuperación de los efectos que produce.
- f. Reducción de actividades sociales, laborales, domésticas o recreativas producido por el consumo.
- g. El consumo continua aunque se conocen los problemas físicos y psicológicos, recidivantes, que están asociados con el consumo.

Estos criterios deben ser evaluados durante un periodo continuo de 12 meses y para que el diagnóstico sea positivo a la dependencia, deberán cumplirse 3 o más de los criterios descritos anteriormente.

En el año 2013, según se informó en el DSM-5<sup>® (7)</sup> un patrón de consumo de alcohol problemático, produce un deterioro o malestar que clínicamente son significativos. Este patrón problemático se puede confirmar cuando se cumplen por lo menos dos de los siguientes criterios:

- a. El consumo de alcohol se produce a menudo en cantidades mayores o durante un período más largo de lo que se pretendía.
- b. Existe el deseo o esfuerzo ineficaz de controlar o interrumpir el consumo de alcohol.
- c. Es grande el tiempo que se necesita para la obtención del alcohol, para el consumo de alcohol o para recuperarse de sus efectos.
- d. El “craving” es real, existe un fuerte deseo por consumir alcohol.
- e. El consumo reiterado de alcohol produce incumplimiento de las obligaciones laborales, académicas o del hogar.
- f. El consumo de alcohol continúa a pesar de los continuos problemas sociales o interpersonales, producidos por los efectos del alcohol.

- 
- g. Las actividades de importancia social, ocupacionales o recreativas están reducidas por causa del consumo de alcohol.
  - h. El consumo de alcohol se produce en situaciones de riesgo o peligro físico.
  - i. El consumo de alcohol continúa a pesar del diagnóstico de un problema físico o psicológico que pudo ser causado o incrementado por el alcohol.
  - j. La tolerancia se produce en dos situaciones:
    - Necesidad de incrementar la dosis de alcohol para conseguir el efecto deseado.
    - Se reduce el deseo de consumir la misma cantidad de alcohol.
  - h. La retirada del alcohol, produce cualquiera de los siguientes efectos:
    - El síndrome de abstinencia característico para el alcohol.
    - El alcohol o cualquier otra sustancia relacionada, se consume para controlar los síntomas de abstinencia.

Es importante resaltar que en la actualidad, el diagnóstico de la dependencia de etanol es un proceso prolongado, que necesita de la participación consciente del individuo dependiente y que la valoración no es completamente objetiva porque no se consideran factores bioquímicos que pueden repercutir en la respuesta fisiológica del organismo tras un consumo.

### **3.2. Patologías producidas por el etanol.**

Los efectos adversos producidos por el consumo de etanol se pueden clasificar según el tipo de intoxicación etílica, por lo tanto existirán efectos adversos a consecuencia de la intoxicación aguda y otros efectos por la intoxicación crónica <sup>(11,61)</sup>.

Cuando una persona sufre una intoxicación etílica aguda, se describe que su estado es de embriaguez o ebriedad. Durante la embriaguez, pueden existir alteraciones neurológicas, digestivas y de conducta que se pueden manifestar en diferente grado, según los niveles sanguíneos de etanol tras la ingesta reciente de bebidas alcohólicas.

Entre las principales alteraciones producidas por la intoxicación etílica se describen las siguientes <sup>(11,38,62)</sup>:

- 
- a. Desinhibición de impulsos sexuales.
  - b. Aumento de la agresividad.
  - c. Deterioro de la capacidad de juicio.
  - d. Lenguaje farfullante.
  - e. Ataxia.
  - f. Disartria.
  - g. Euforia.
  - h. Náuseas.
  - i. Vómitos.
  - j. Diplopía.
  - k. Hipotensión.
  - l. Hipotermia.

Si la dosis consumida es letal para el sujeto, se puede llegar al coma e inclusive a la muerte. Es importante considerar que la ingesta de la bebida alcohólica no se produjo junto a otras sustancias psicoactiva, en este caso la intoxicación es mixta y la valoración toxicológica requiere de otras consideraciones.

La intoxicación etílica crónica tiene una significancia diferente a la aguda, el diagnóstico clínico del individuo debe considerar el consumo continuo y abusivo de bebidas alcohólicas. Las alteraciones producidas se pueden agrupar en neurológicas y somáticas, y según el grado de la alteración se pueden diagnosticar como patológicas.

Es importante indicar que, durante el inicio de la intoxicación etílica crónica, las alteraciones psicosomáticas pueden pasar inadvertidas físicamente, es decir el sujeto presenta pocas sintomatologías de esta intoxicación; esto puede deberse al grado de tolerancia que el individuo ha ganado por el etanol.

Como ya se mencionó, la OMS indicó en el 2005 que el “consumo de riesgo y perjudicial o nocivo de alcohol” era un factor causante de muchas patologías <sup>(2)</sup>. Estas patologías se pueden agrupar según el sistema orgánico o fisiológico afectado <sup>(63)</sup>, por lo que los principales sistemas afectados por el etanol tras una ingesta continua y abusiva de bebidas alcohólicas son: el sistema nervioso, el sistema renal, el sistema gastrointestinal, el sistema hepático y el sistema cardiovascular.

---

De esta forma las patologías que se pueden presentar en un sujeto que sufre una intoxicación etílica crónica son variadas y entre las más importantes podemos describir las siguientes <sup>(11,57,58,59,61,64,65)</sup>.

a. Depresión del sistema nervioso central.-

El etanol es un depresor del sistema nervioso y su ingesta abusiva puede causar problemas específicos como: daños encefálicos, pérdida de la memoria, perturbaciones del sueño, las alucinaciones alcohólicas y el delirium tremens. Pero también se pueden generar síndromes neuropsiquiátricos, como la encefalopatía de Wernicke o la psicosis de Korsakoff, estas patologías están relacionadas con trastornos nutricionales.

b. Daño en el sistema gastrointestinal.-

Por el consumo prolongado de etanol, es frecuente que se produzcan hemorragias por gastritis, úlceras gástricas o úlceras esofágicas, esta última relacionada con afecciones hepáticas. La pérdida de sangre progresiva puede llegar a ser mortal para el individuo patológico. La inflamación y la formación de fibrinógeno en el páncreas son síntomas de la pancreatitis alcohólica.

c. Alteraciones cardiovasculares.-

La miocardiopatía alcohólica es la principal afección que se produce en el corazón por el consumo abusivo y prolongado de bebidas alcohólicas. En este estado, el órgano se encuentra congestivo y dilatado, lo que puede ser causa fundamental de muerte.

La intoxicación crónica de etanol influye en la hipertensión arterial, lo que conlleva en un tiempo, a problemas renales en el individuo.

También está relacionado los niveles patológicos de las lipoproteínas séricas, así el *High Density Lipoprotein* (HDL), que pueden provocar una cardiopatía isquemia. Este desnivel está relacionado con afecciones metabólicas y problemas hepáticos.

d. Afectación renal.-

Existen dos problemas muy marcados que se produce tras el consumo crónico de bebidas alcohólicas, el primero es la inhibición de la hormona antidiurética (HAD) o arginina vasopresina (AVP) y el segundo es la degeneración estructural del órgano, especialmente las modificaciones tubulares.

La afectación renal está relacionada con problemas gástricos, hepáticos y cardiovasculares.

---

e. Hepatopatías.-

El alcohol es una hepatotóxina y el daño crónico del hígado se produce cuando la ingesta es habitual y abusiva.

Los problemas relacionados con el hígado pueden ir desde una simple acumulación grasa en los hepatocitos hasta la degeneración del órgano por la fibrosis acumulada. Existen 3 categorías importantes para describir la hepatopatía alcohólica: la esteatosis, la hepatitis y la cirrosis, y entre ellas puede existir más graduaciones.

La cirrosis está relacionada con hipertensión portal, problemas cardiovasculares y un aumento del riesgo de carcinoma hepatocelular.

f. Trastornos nutricionales.-

El consumo crónico de bebidas alcohólicas puede producir desnutrición y carencia de vitaminas, especialmente las del complejo B. Por ejemplo la carencia de ácido fólico se relaciona con la megablastosis y la carencia de tiamina se relaciona con la encefalopatía de Wernicke.

También está afectada la absorción y reabsorción de oligoelementos esenciales, como el calcio o el magnesio, importantes para el funcionamiento de muchos procesos celulares.

g. Afecciones metabólicas.-

El consumo crónico de alcohol, a lo largo de un tiempo produce diferentes alteraciones metabólicas, entre las más importantes están: la hipoglicemia alcohólica y la cetoacidosis alcohólica. Estas dos afecciones se producen por la alteración de la ruta metabólica del etanol, motivado por un ritmo metabólico elevado y por la alta concentración del sustrato, el etanol absorbido tras el consumo de bebidas alcohólicas.

Es muy importante indicar que las patologías producidas en el bebedor, por el consumo crónico de bebidas alcohólicas, no son aisladas, ni secuenciales. Según la relación entre la dosis consumida, el ritmo de consumo y el metabolismo del individuo, las patologías se pueden desarrollar de forma gradual y sin control.

---

#### 4. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL CONSUMO DE ALCOHOL.

El alcohol es una sustancia psicoactiva, cuyo consumo es legal en muchos países y su restricción obedece a circunstancias específicas: religión, sociedad, salud o situación legal. Como cualquier otra droga su consumo puede ser esporádico o habitual <sup>(38)</sup>, afectando la capacidad del individuo e impulsando diferentes actos ilegales. La culpabilidad de un sujeto, frente a un acto delictivo puede verse afectada por la valoración del consumo de alcohol tras la ingesta de bebidas alcohólicas.

En España, el consumo de alcohol o de bebidas alcohólicas, los efectos que el consumo produce o las acciones cometidas tras su consumo están tipificados en diferentes documentos legislativos.

A continuación indicamos los principales artículos de documentos legislativos donde se comentan acciones relacionadas con el consumo de alcohol:

a. Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal<sup>(66)</sup>

Las disposiciones generales de los delitos, las responsabilidades, las penas, medidas de seguridad y demás consecuencias de la infracción penal con relación a la influencia de la presencia de alcohol en el individuo están tipificadas como: causas de exención de responsabilidad penal (artículo 20), causas de atenuación de la de responsabilidad criminal (artículo 21) y circunstancias agravantes de responsabilidad criminal (artículo 22).

También se describe que la dependencia al alcohol (artículo 80) o que la participar en programas de deshabitación al consumo de alcohol (artículos 83), son justificantes para la suspensión de la ejecución de las penas privativas de libertad.

La pena impuesta al sujeto que trafique con menores de edad o personas con incapacidad, utilizando sustancias perjudiciales para la salud, están descritos en el artículo 232.

En el artículo 364 se resaltan las penas impuestas relacionadas con los delitos contra la salud pública, relacionadas con la adulteración de bebidas destinadas para el comercio y consumo.



---

Con referencia a la seguridad vial, se indican las penas para conductores que circulen bajo la influencia de bebidas alcohólicas (artículo 379) y para aquellos que se nieguen a someterse a las pruebas para la comprobación de las tasas de alcoholemia (artículo 383).

- b. Ley 209/1964, de 24 de diciembre, Penal y Procesal de la Navegación Aérea<sup>(64)</sup>.

Se describen como delitos contra el tráfico aéreo, indicado como abandono de la aeronave o del servicio encontrarse bajo la influencia de bebidas alcohólicas cuando: el comandante emprende el vuelo o durante la navegación de la nave (artículo 31) o cuando la tripulación o el controlador de tráfico se encuentren prestando servicio (artículo 32).

- c. Ley Orgánica 14/2015, de 14 de octubre, del Código Penal Militar<sup>(64)</sup>.

Se describe la pena impuesta a todo militar, que en acto de servicio, quebrante su servicio por encontrarse en estado de embriaguez e intoxicación por drogas tóxicas. La descripción se encuentra en el artículo 70 de esta Ley Orgánica.

- d. Real decreto de 14 de septiembre de 1882 por el que se aprueba la Ley de Enjuiciamiento Criminal<sup>(64)</sup>.

Con referencia a la cantidad de alcohol en sangre, en el artículo 796, se describe la actuación de la Policía Judicial para la práctica de las pruebas de alcoholemia ajustadas a lo establecido en la legislación de seguridad vial.

- e. Real Decreto Legislativo 339/1990, de 2 de marzo, por el que se aprueba el Texto Articulado de la Ley sobre Tráfico, Circulación de Vehículos a Motor y Seguridad Vial<sup>(67)</sup>.

En el artículo 12 se describen las normas generales relacionadas con las bebidas alcohólicas y las drogas para la no circulación de conductores que superen las tasas de alcohol reglamentadas, la obligación que tienen los conductores para someterse a las pruebas para la detección de alcohol en aire espirado, la existencia de procedimientos para la prueba comentada y la posibilidad repetir la prueba, por petición del interesado, por análisis en sangre.

- 
- f. Real Decreto 1428/2003, de 21 de noviembre, por el que se aprueba el Reglamento General de Circulación para la aplicación y desarrollo del texto articulado de la Ley sobre tráfico, circulación de vehículos a motor y seguridad vial, aprobado por el Real Decreto Legislativo 339/1990, de 2 de marzo <sup>(68)</sup>.

Se establecen las normas de circulación para vehículos a motor y para la seguridad vial. En los artículos 20 a 26 se describe el límite permitido de alcohol en sangre (0,5g/L) y en aire espirado (0,25 mg/L), lo relacionado a la investigación de la alcoholemia la detección de etanol en aire espirado y las prácticas relacionadas con estas pruebas, la sanción de la conducción bajo los efectos del alcohol, y establecen el régimen de penas así como las obligaciones para los agentes de seguridad vial y el personal sanitario.

Después de lo indicado, se concluye que existen métodos específicos para detectar la cantidad de etanol tras la ingesta reciente de bebidas alcohólicas legales y valorar los actos cometidos bajo la influencia de esta sustancia psicoactiva. Lo que no se describe es la forma para categorizar el grado de intoxicación o dependencia que un individuo presenta, en un momento específico, y relacionarlo con un presunto acto delictivo.

Como ya lo mencionamos, la alcoholemia es la medida que permite conocer la cantidad de etanol que circula por la sangre de un sujeto. Mientras que en España el valor máximo de alcoholemia permitida es de 0,5 gramos de alcohol por litro (g/L) de sangre o a 0,25 miligramos de alcohol por litro de aire espirado (mg/L), en otros países los valores y las unidades de medidas pueden ser diferentes porque su legislación lo permite.

Un reporte de la *International Center for Alcohol Policies* (ICAP) <sup>(69)</sup>, publicado en el 2002, informó sobre los límites mundiales de la medición del contenido de etanol en sangre o *Blood Alcohol Content* (BAC) <sup>(33)</sup>, valores que fueron expresados en miligramos por mililitro (mg/mL) de sangre y que a continuación, describimos algunos de ellos:

- a. Europa
- 0,5 en Portugal, Francia o Alemania.
  - 0,2 en Noruega o Suecia.
  - 0,0 en Hungría o Eslovaquia.

- 
- b. América
- 0,8 o 1,0 en los Estados Unidos de América, según el estado.
  - 0,5 en Argentina o Perú.
- c. Asia
- 0,8 en Singapur y Tailandia.
  - 0,5 en Corea del Sur.
- d. África
- 0,8 en Zimbabue.
  - 0,5 en Sudáfrica.

El nivel del BAC, que se corresponde con el resultado de la determinación analítica de la alcoholemia, es un valor real y concluyente. A partir de este resultado se pueden realizar diferentes evaluaciones como: calcular la alcoholemia teórica máxima (Figura 15), evaluar la curva de la alcoholemia (Figura 16), estimar la alcoholemia en gramos por kilogramo utilizando la fórmula de Widmark (Figura 17) y conocer el valor de la alcoholemia en diferentes tiempos utilizando el coeficiente de Widmark (Figura 18) o el coeficiente de Dubowski (Figura 19).

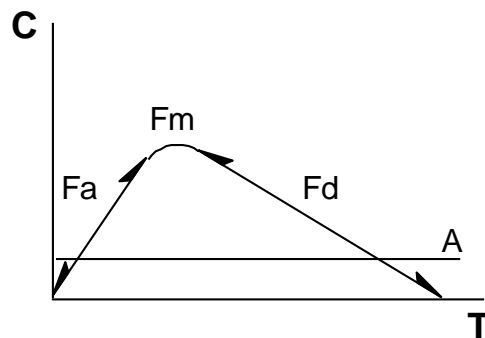
Los parámetros mencionados anteriormente <sup>(11,38,45)</sup> deben relacionarse con el metabolismo del etanol, que cada individuo tiene posterior a una ingesta de bebidas alcohólicas. Esta valoración es un criterio muy importante antes de realizar cualquier cálculo matemático.

$$C = \frac{EtOH}{V \times P}$$

**Figura 15:** Fórmula del cálculo de la alcoholemia teórica máxima

C = Alcoholemia (gramos de etanol por litro); EtOH = Cantidad de etanol ingerido (g)

P = Peso del individuo (Kg); V = Vol. de distribución (0,7 hombres y 0,6 mujeres) (L/Kg)



**Figura 16:** Representación general de la curva de alcoholemia

C = Alcoholemia; T = Tiempo; A = Alcoholemia permitida

Fa = Fase ascendente; Fm = Fase meseta; Fd = Fase descendente

$$C = \frac{\text{EtOH}}{R \times P}$$

**Figura 17:** Fórmula de Widmark para el cálculo de la alcoholemia teórica

C = Alcoholemia (gramos de etanol por kilogramo); EtOH = Cantidad de etanol ingerido (g)

P = Peso del individuo (Kg); R = Coeficiente de reparto (0,68 hombres y 0,55 mujeres)

$$Ca = C + (W \times T_{(\text{min})})$$

$$Ca = C + (D \times T_{(\text{horas})})$$

**Figura 18:** Fórmula utilizando el coeficiente de eliminación de Widmark (W)

**Figura 19:** Fórmula utilizando el coeficiente de eliminación de Dubowski (D)

C = Alcoholemia conocida; Ca = Alcoholemia que se quiere conocer

T = Tiempo; W = 0,0025 g/Kg/min; D = 0,150 g/L/hora hombres y 0,180 g/L/hora mujeres

---

## 5. METABOLISMO DEL ETANOL.

Desde el punto de vista fisiológico, el etanol ingresa al organismo casi siempre por vía oral, existiendo la posibilidad de ingresar también por vía dérmica, inhalatoria y otras formas que dependen de los hábitos sociales del individuo. Para el consumo de bebidas alcohólicas la vía de absorción más importante es la oral.

Del total de etanol que ingresa, el 70% es absorbido al organismo en los intestinos, después se distribuye por el sistema porta al corazón y por el sistema circulatorio a todo el organismo en un tiempo de 30 minutos hasta 180 minutos. Durante esta distribución se produce el anabolismo y el catabolismo del etanol para producir diferentes metabolitos <sup>(70,71)</sup>. En teoría la determinación de la alcoholemia, mide la cantidad de etanol distribuido por la sangre en el momento de la recogida de la muestra.

La biotransformación del etanol se inicia cuando esta sustancia llega al hígado y se desarrolla en 3 fases sistemáticas: alcohol – deshidrogenasa, catalasa y el *Microsomal Ethanol Oxidizing System* (MEOS) o sistema de oxidación mirosomal del etanol.

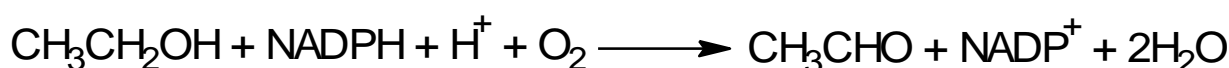
El sistema ADH funciona porque la enzima alcohol – deshidrogenasa y el cofactor  $\text{NAD}^+$  permiten un proceso de óxido–reducción donde el etanol se biotransforma hasta acetaldehído <sup>(72,73,74)</sup>, principal metabolito del etanol, como se describió en la Figura 14.

El sistema catalasa se activa cuando la concentración de peróxido de hidrógeno es perjudicial para el organismo. Este agente oxidante se obtiene del catabolismo de las purinas. Como protección hepático, cuando el etanol está presente en el hígado, se produce otro proceso de óxido–reducción, lo cual permite que el etanol se biotransforme hasta acetaldehído <sup>(72,73,75)</sup>. El proceso se describe en la figura 20.



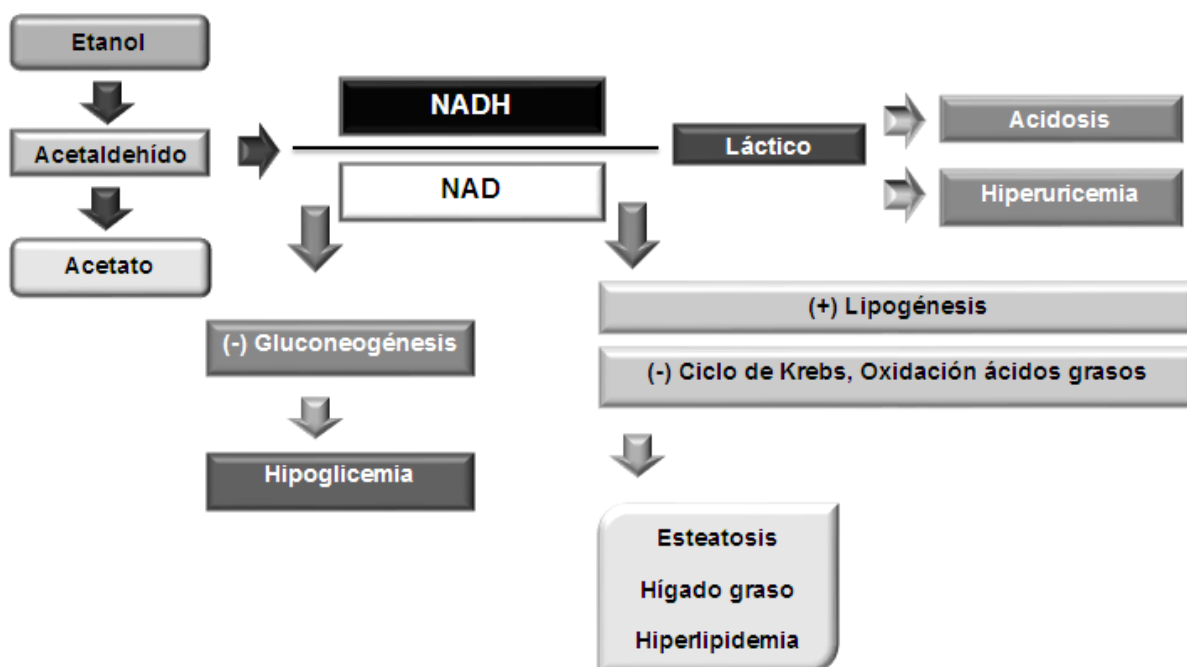
**Figura 20:** Oxidación del etanol por el sistema catalasa

El sistema MEOS se desarrolla en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos y los agentes responsable del proceso de óxido-reducción es el citocromo P450 junto a la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida, cuyas siglas en inglés es NADPH <sup>(72,73,76)</sup>. Para que este proceso de biotransformación se desarrolle, es importante que la concentración de etanol en el hepatocito sea muy elevada, ya que el sistema MEOS solo se activa cuando el sistema ADH no puede metabolizar el etanol presente. El proceso se describe en la siguiente figura.



**Figura 21:** Oxidación del etanol por el sistema MEOS

Si un individuo consume bebidas alcohólicas en exceso y la concentración de etanol supera el valor máximo que puede metabolizar o su tasa metabólica <sup>(58, 73)</sup>, se puede iniciar un proceso descontrolado por el cual se desarrollaran diferentes patologías en su organismo. Los procesos por los que se inician estas patologías se describen en la siguiente figura 22.



**Figura 22:** Procesos patológicos por el exceso de consumo de etanol

---

Terminado el metabolismo, el 95% del etanol inicial se puede eliminar como metabolito, un 3% se puede eliminar como etanol sin metabolizar y el resto se puede acumular en el organismo. Este metabolismo será diferente según la concentración inicial de etanol y las costumbres de consumo, así como la fisiología, trastornos y patologías del individuo <sup>(77,78)</sup>.

No obstante, aunque la muestra por excelencia es la sangre, porque es el lugar por donde se distribuyen todos los compuestos o marcadores de interés analítico, la demostración de la existencia de una ventana cronológica y el estudio retrospectivo para el consumo de etanol son ventajas para el uso del pelo como muestra forense frente a la sangre y otros materiales biológicos <sup>(49,50)</sup>.

Cada muestra tiene sus ventajas y desventajas, que incluyen la concentración del marcador que se cuantificará en esa muestra, el método analítico a seguir, el tratamiento que se debe seguir para trabajar con esa muestra o la valoración que se desea realizar con los resultados obtenidos por analizar una muestra en particular.

Por marcador analítico de etanol se entiende el compuesto químico que se cuantificará para comprobar el consumo de alcohol y valorar lo ocurrido durante la intoxicación alcohólica en un acto delictivo, un proceso administrativo o un proceso laboral.

Conocidos también como *state markers* <sup>(79)</sup> los marcadores puede reflejar la concentración de alcohol en sangre (alcoholemia) en un tiempo específico o el tipo de bebedor o patologías ocasionadas por el consumo y se clasifican como marcadores directos e indirectos <sup>(80,81,82)</sup>.

Existen también los llamados marcadores genéticos <sup>(83,84)</sup>. Para valorar estos marcadores se necesita incluir el estudio genómico del individuo y cómo influye en el metabolismo del etanol. Para el estudio experimental que se detalla más adelante, no se incluye el análisis de algún parámetro genético porque todas las muestras proceden de cadáveres judiciales y no recibimos la autorización para desarrollar este tipo de estudio.

---

## 5.1 Marcadores directos del etanol.

Son marcadores directos el propio alcohol etílico y todos los metabolitos que son producidos directamente a partir del etanol. Casi todos los marcadores directos se obtienen por la conjugación del etanol con otra molécula endógena del organismo. A continuación se describen los marcadores directos, que según nuestro criterio, serán los más importantes para valorar el consumo de etanol por la ingesta de bebidas alcohólicas:

a. Etanol (EtOH):

Este compuesto se puede detectar en diferentes muestras biológicas, como ya se comentó hay una gran variedad de muestras utilizadas para su determinación, siendo las más importantes: sangre, orina y aire espirado. La determinación de etanol en cualquier muestra biológica no permite distinguir entre el bebedor agudo o el bebedor crónico, porque la cantidad encontrada, de alcohol etílico, solo confirma su existencia en el momento en que la muestra analizada fue recogida. A continuación se indica la fórmula molecular del etanol, resaltando el radical etilo:

- Fórmula molecular del etanol  $\rightarrow \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$

b. Esteres etílicos de los ácidos grasos (EEAG) <sup>(50,85,86,87)</sup>:

Son conocidos en la literatura científica como *Fatty Acid Ethyl Esters* (FAEE`s). Estas biomoléculas se producen por la reacción entre los ácidos grasos, la Co-A, el etanol y la D-fosfolipasas, generando biomoléculas con grandes tamaños moleculares. Existen muchos ácidos grasos, cuyas estructuras pueden ir desde los 12 hasta los 20 carbonos, que pueden generar a estos metabolitos. Según el tipo de muestra será necesario la determinación de varios EEAG, un ejemplo es el caso del análisis en el pelo donde se recomienda la valoración de los resultados de las siguientes biomoléculas: miristato de etilo, palmitato de etilo, oleato de etilo y esterato de etilo; en un bebedor abusivo de alcohol, la suma de las concentraciones de los cuatro es igual o mayor que 1 ng/mg. Son marcadores de consumo agudo y crónico de alcohol, y la valoración depende de la muestra utilizada durante el ensayo analítico. A continuación se indican las fórmulas moleculares de los 4 EEAG mencionados, resaltando el radical etilo proveniente del etanol:



- Fórmula molecular del miristato de etilo  $\rightarrow \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
- Fórmula molecular del palmitato de etilo  $\rightarrow \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
- Fórmula molecular del oleato de etilo  $\rightarrow \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
- Fórmula molecular del esterato de etilo  $\rightarrow \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

c. Etilglucurónido (EtG):

Este metabolito es el resultado de la conjugación del etanol y el ácido glucorónico, según la cantidad de etanol en exceso la concentración de EtG puede variar. Es un marcador de consumo agudo y de consumo crónico de etanol, esta valoración depende de la muestra utilizada durante el ensayo analítico. En el siguiente apartado se describe con detalle al EtG. Lo que se resalta a continuación es el radical etilo, proveniente del etanol en la fórmula molecular del EtG:

- Fórmula molecular del etilglucurónido  $\rightarrow \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

d. Etilsulfato (EtS) <sup>(50,88,89)</sup>:

Durante la conjugación que origina al EtG se puede producir una sulfotransferencia. El etanol después de una sulfato conjugación con la 3'- fosfoadenosina 5'- fosfosulfato y la acción de sulfotransferasa citosólica produciéndose EtS. La valoración de su concentración, con el consumo agudo y crónico de etanol, tiene mucha importancia cuando se relaciona con la del EtG. A continuación se indica la fórmula molecular del EtS, resaltando el radical etilo proveniente del etanol:

- Fórmula molecular del etilsulfato  $\rightarrow \text{HPO}_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

e. Etilbenzoilecgonina (EBE) <sup>(90,91,92)</sup>:

Este metabolito es un poderosos cardiotóxico y también es llamado cocaetileno (CE). Se puede generar de forma endógena especialmente en células del hígado, pero también en células del riñón, cuando reaccionan el alcohol y la cocaína en presencia de D-carboxilesterasa. Su determinación puede relacionar el consumo de etanol y el consumo de cocaína. Al observar la siguiente formula molecular, podemos apreciar resaltado el radical etilo que proviene del etanol:

- Fórmula molecular del etilbenzoilecgonina  $\rightarrow \text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$

f. Fosfatidiletanol (PE) <sup>(50,83,93,94,95)</sup>:

Este metabolito es conocido en la literatura científica como *Phosphatidylethanol* (PEth). La fosfatidilcolina puede reaccionar con el etanol siguiendo una vía metabólica secundaria y producir fosfatidiletanol, esta macromolécula producida puede acumularse en las diferentes membranas celulares o tejidos del organismo. Por su baja eliminación se puede utilizar como un marcador del consumo crónico de alcohol. A continuación se indica la fórmula molecular del PE, resaltando el radical etilo proveniente del etanol:

- Fórmula molecular del fosfatidiletanol  $\rightarrow (\text{R}_1, \text{R}_2)\text{-C}_5\text{O}_4\text{-HPO}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$

Donde  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  pueden ser cadenas de ácidos grasos.

g. Acetaldehído (AcCHO) <sup>(96,97,98)</sup>:

El acetaldehído es el principal producto del metabolismo del etanol y en grandes cantidades puede generar reacciones irreversibles con restos aminos de las proteínas, generando daños en la estructura y función de estas proteínas. Su determinación confirma la presencia del etanol antes de su metabolismo. Los derivados, que también pueden ser analizados, son conocidos como aductos del acetaldehído. Como se puede apreciar en la siguiente fórmula molecular, no hay presencia del radical etilo del etanol; no se puede olvidar que este compuesto se obtiene por la oxidación del etanol:

- Fórmula molecular del acetaldehído  $\rightarrow \text{CH}_3\text{-CHO}$

## 5.2 Marcadores indirectos del etanol.

Por el contrario, los marcadores indirectos, se producen por alteraciones patológicas o metabólicas ocasionadas por elevadas concentraciones de etanol en el organismo, y la valoración de muchos de estos marcadores depende de la comparación de los valores detectados frente a rangos normales o parámetros fisiológicos <sup>(81,95,99)</sup>. Para este tipo de marcadores, valores

---

elevados, también se pueden deber a patologías no relacionadas con el consumo crónico de etanol. A continuación se describen algunos de los marcadores indirectos más importantes:

a. Congéneres del Etanol.-

Metanol (MeOH) <sup>(78,79,100,101,102)</sup>:

En el organismo humano, el metabolismo del metanol se produce por la participación de la enzima ADH, siempre que los niveles de etanol son bajos. Cuando la concentración de etanol en sangre es elevada el metabolismo del metanol se detiene, esto se produce porque la ADH tiene una afinidad por el etanol casi diez veces mayor que por el metanol. Niveles altos de metanol, siempre que la bebida consumida no esté adulterada, sugiere la confirmación del consumo crónico de etanol.

b. Derivados del acetaldehído.-

Salsolinol <sup>(87,88,103)</sup>:

Este compuesto es un derivado del acetaldehído y está relacionado con las tetrahydroisoquinolinas (TIQs) y  $\beta$ -carbolinas. Cuando el acetaldehído reacciona con la dopamina se genera una neurotoxina endógena, que se presenta como una mezcla racémica y, aunque no es producido directamente a partir de etanol, su determinación puede ser utilizada para valorar el consumo crónico de etanol.

c. Marcadores de “resaca” <sup>(104,105,106)</sup>.-

5-hidroxitriptofol (5-HTOL):

El catabolismo de la serotonina es modificado por la inhibición de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) debido a la presencia excesiva de etanol en el organismo, el producto final de esta reacción es el 5-HTOL que puede excretarse por la orina.

Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA):

El exceso de etanol en el organismo produce que el metabolismo de este compuesto se redirija y se transforme en 5-HTOL. Por lo tanto lo más importante es valorar la relación entre 5-HTOL y 5-HIAA, juntos son conocidos como marcadores de resaca. Esta relación permite la valoración del consumo reciente de alcohol.

---

d. Enzimas hepáticas <sup>(99,107, 108,109,110,111,112)</sup> .-

Gamma-glutamyltransferasa (GGT):

La gamma-glutamyl-transferasa sérica es el marcador de laboratorio más ampliamente usado como test para abuso de alcohol, debido a su relación con el daño hepático.

Transaminasas:

La Aspartato-aminotransferasa (AST) o Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y la Alanito-aminotransferasa (ALT) o glutamato piruvato transaminasa (GPT) son las enzimas más frecuentes que marcan un daño hepático por lisis celular. El cociente entre GOT y GPT indica daño hepático y la posible causa por consumo de alcohol.

e. Volumen corpuscular medio (MCV) <sup>(81,108,109)</sup> .-

El volumen corpuscular medio es la estimación del tamaño de los hematíes y su relación con el hematocrito. Existe una relación entre la macrocitosis y el consumo de alcohol, pero no tan clara como la GGT.

f. Transferrina deficiente de carbohidratos (CDT) <sup>(50,81,99,105,106,113,114)</sup> .-

Este metabolito puede ser utilizado en la valoración del consumo crónico de etanol, conociendo solo sus valores diagnósticos o relacionando estos valores, con otros marcadores indirectos, como por ejemplo la GGT.

Las transferrinas son glicoproteínas cuya función es la de transportar  $\text{Fe}^{+3}$  por el organismo. Estas pueden tener varias isoformas, las cuales se distinguen por la cantidad de parte glúcida que posee la glicoproteína, así tenemos las siguientes isoformas: disialo, trisialo, pentasialo, hexasialo y la tetrasialotransferrina que es la de mayor proporción en un individuo sin problemas con el consumo de alcohol.

Cuando los niveles de las isoformas asialo y monosialotrasferrina aparecen, y aumenta el nivel de la disialotrasferrina, se puede diagnosticar la deficiencia de carbohidratos en la transferrina y relacionar su elevada presencia con el consumo de etanol.

El etanol incrementa la pérdida gradual de la parte glúcida de la biomolécula, siendo mayor este cambio cuando existe abuso en el consumo de alcohol. Este metabolito solo se puede detectar en sangre y existen estudios que confirman la estabilidad de este metabolito en muestras post mortem.

---

g. HDL-Colesterol y Triglicéridos <sup>(61,62,96,97,115,116)</sup>.-

Un consumo excesivo de alcohol altera el metabolismo y el transporte lipídico del organismo, pero no son buenos marcadores porque esta anomalía se puede generar por otros trastornos.

h. Cuerpos Cetónicos <sup>(96,97,99,117,118)</sup>.-

Los principales cuerpos cetónicos descritos en la literatura son la acetona, el acetoacetato y el D-β-hidroxibutirato, todos producidos cuando el proceso metabólico de etanol se desvía a rutas patológicas. Existen estudios de casos forenses en donde se detectó la presencia de cuerpos cetónicos en cadáveres cuya causa de muerte fue la cetoacidosis alcohólica relacionada con el consumo crónico de etanol.

La valoración del consumo de etanol con estos marcadores es limitada porque en situaciones específicas, como el ayuno o la diabetes, los niveles de cuerpos cetónicos también se elevan.

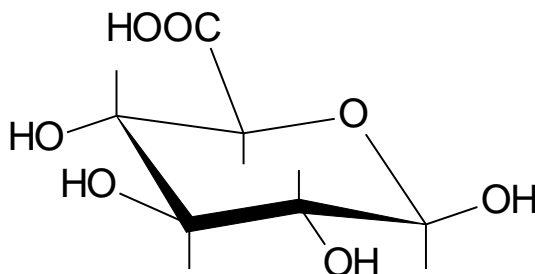
i. Dolicol <sup>(119,120)</sup>

Es un alcohol isoprenoide insaturado que contiene alrededor de 19 monómeros de isopreno y que funciona como un transportador en la biosíntesis de glicoproteínas. La presencia de etanol en exceso puede inhibir el metabolismo del dolicol, lo cual tiene una relación con el consumo de alcohol.

## 6. ETILGLUCURONIDO

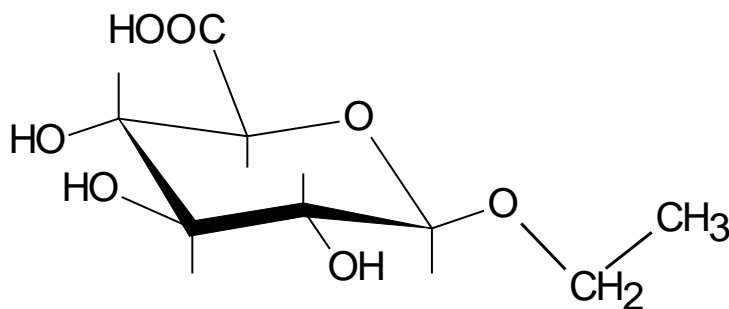
El etilglucurónido es una molécula que según la Chemical Abstracts Service (CAS), existe una molécula registrada con el número 17685-04-0 y que según el sistema internacional I.U.P.A.C. se llama (2S,3S,4S,5R,6S)-6-ethoxy-3,4,5-trihydroxyoxane-2-carboxylic acid.

Es un metabolito directo del etanol que se produce por biosíntesis en el hígado. Cuando en el medio hay una concentración elevada de etanol, este se conjuga por un proceso de anabolismo con el ácido glucurónico, de peso molecular igual a  $C_6H_{10}O_7$  y cuya estructura se detalla en la figura 23.



**Figura 23:** Estructura del ácido glucurónico

Es conocido en la literatura técnica y científica como ethyl- $\beta$ -D-glucopyranosiduronic acid o ethyl- $\beta$ -D-6-glucosiduronic acid. Este compuesto tiene una fórmula molecular igual a  $C_8H_{14}O_7$ , por lo tanto un peso molecular igual a 222,193 g/mol y es conocido como etilglucuronido (EtG) <sup>(121)</sup>. Su estructura molecular se detalla en la figura 24.



**Figura 24:** Estructura del etilglucurónido

---

Como sustancia química, es un compuesto no volátil, soluble en agua y en solventes polares como el metanol, tiene una alta estabilidad de almacenamiento.

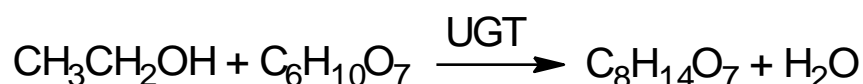
La primera publicación del EtG se remonta a la década de 1950, cuando se informó sobre el aislamiento de este compuesto de la orina de conejo (Kamil *et al.*, 1952).

Sobre el EtG hay diferentes estudios, siempre referido a su importancia como marcador de consumo de alcohol étlico. Así podemos describir que la información más importante se resume en: estudios sobre su biosíntesis, su extracción en diferentes muestras biológicas, su determinación por diferentes metodologías analíticas y la relación de sus niveles con el consumo agudo o crónico de etanol tras la ingesta de bebidas alcohólicas.

La importancia de relacionar los niveles de EtG con el tipo de consumo, se explica si entendemos que aproximadamente el 95% del etanol absorbido se biotransforma en acetaldehído y que del etanol restante, una fracción muy pequeña (< 0,1%) puede conjugarse con el ácido glucurónico y formar el etilglucuronido <sup>(122)</sup>. Un consumo elevado de etanol aumentará la fracción muy pequeña y por lo tanto la cantidad de EtG aumentará y podrá ser detectable en equipos instrumentales con alta sensibilidad.

## 6.1 El etilglucurónido en el organismo humano.

Aquella pequeña fracción de etanol que no es metabolizado y que tampoco es eliminado del organismo, se puede biotransformar hasta etilglucurónido durante la fase II del proceso de conjugación en el retículo endoplásmico de las células del hígado, reaccionando con el ácido glucurónico y catalizado por la uridina difosfato–glucuronosiltransferasa (UGT) o *uridine diphosphate – glucoronysiltransferase* <sup>(123)</sup>, como se describe en el siguiente proceso:



**Figura 25:** Reacción de biotransformación (conjugación) del etilglucurónido

---

Una de los primeros estudios cinéticos del EtG en humanos los sujetos (Schmitt *et al.*, 1997) concluyó que después del consumo de alcohol, los niveles de EtG en el suero sanguíneo disminuyen exponencialmente, calculando una vida media de 2 a 3 horas y un tiempo de detección entre 6 a 18 horas aproximadamente. Estos valores podían variar según la dosis de alcohol consumida y el metabolismo del sujeto.

Otros estudios comparativos permitieron conocer que después de la ingesta de alcohol, el EtG se puede detectar en el suero aproximadamente 8 horas después de la eliminación total de etanol del organismo (Schmitt *et al.*, 2007; Wurst *et al.*, 1999; Weinmann *et al.*, 2004) <sup>(124)</sup>.

Posteriormente, se pudo valorar la relación entre el tiempo de vida media del EtG y la velocidad de eliminación por la orina, esta valoración estimó un rango entre los 3 y 5 días posteriores a la ingesta de alcohol controlada sin diferenciar el tipo de bebedor (Borucki *et al.*, 2005)

Un estudio, por electroforesis capilar, desarrollado para comprobar los parámetros fisicoquímicos que permiten la formación de EtG, lo comparó con otras biomoléculas, como el lactato, y demostró que el pK de formación era de 3,21 (Krivánková *et al.*, 2005).

Después, un estudio en sujetos vivos (Wojcik *et al.*, 2007) mostró que la detección de EtG en orina, por cromatografía líquida acoplada a un detector de masas en tándem (LC/MS-MS), no tiene eficacia cuando se relaciona con consumo de alcohol en dosis bajas. En cambio, cuando la dosis es alta se pudo determinar el EtG en la orina, 24 horas después de este consumo de alcohol.

Otro estudio, de características farmacocinéticas, permitió comprobar una relación entre la cantidad de alcohol consumido, la cantidad de EtG distribuido en sangre y la cantidad de EtG por eliminar en la orina. De esta forma si la concentración máxima de etanol en sangre es 0,58 g/L, la concentración máxima de EtG en sangre será 0,32 mg/L y si la concentración de etanol en orina es 0,6 g/L, la concentración máxima de EtG en orina será 46,5 mg/L (Høiseth *et al.*, 2007) <sup>(125)</sup>.

Cuando el organismo no puede eliminar, normalmente, la cantidad de EtG conjugado de forma endógena, se inicia un proceso de acumulación. La principal muestra utilizada para valorar esta acumulación de EtG por la ingesta excesiva de etanol es el pelo; en esta muestra se



---

puede encontrar concentraciones muy bajas de EtG, valores que se estiman en picogramos (pg) por miligramo de muestra (Politi *et al.*, 2007) <sup>(126)</sup>.

## **6.2 Determinación de etilglucurónido en sangre, orina y pelo.**

Los resultados de EtG en sangre y orina permiten la valoración del consumo reciente de alcohol. Las investigaciones relacionadas con la determinación de EtG en este tipo de muestras se realizan desde hace años e informan de diferentes variables que pueden influir en los resultados, como por ejemplo: estabilidad en muestras post mortem, relación de EtG con el tipo de bebedor o el tratamiento realizado a la muestra antes del análisis. Entre las más importantes del nuevo siglo tenemos a:

- a. Determinación de EtG en suero y orina (Janda and Alt, 2001) <sup>(127)</sup>.
- b. Determinación de EtG en orina (Weinmann *et al.*, 2004) <sup>(128)</sup>.
- c. Determinación de EtG en suero y orina (Politi *et al.*, 2005) <sup>(129)</sup>.
- d. Determinación de EtG en sangre y orina (Schloegl *et al.*, 2006) <sup>(130)</sup>.
- e. Determinación de EtG en suero (Morini *et al.*, 2007) <sup>(131)</sup>.

Los estudios experimentales de la acumulación de EtG en pelo humano permite la valoración del consumo crónico de alcohol étílico; en este tipo de estudios la *Society of Hair Testing* (SoHT) <sup>(51)</sup> informa sobre los consensos relacionados con las variables que influyen en la determinación de EtG en pelo, como por ejemplo: la longitud del pelo, el tipo de pelo o el uso de productos cosméticos. Entre los estudios más importantes del siglo actual podemos mencionar a:

- a. Determinación de EtG en pelo relacionado con el consumo de alcohol (Skopp *et al.*, 2000; Alt *et al.*, 2000) <sup>(132)</sup>.
- b. Determinación de EtG en pelo con técnicas analíticas específicas (Janda *et al.*, 2002) <sup>(133)</sup>.
- c. Determinación de EtG en pelo y el consumo crónico de alcohol (Jurado *et al.*, 2004) <sup>(134)</sup>.
- d. Determinación de EtG en pelo en bebedores sociales, bebedores crónicos y abstemios (Yegles *et al.*, 2004) <sup>(135)</sup>.
- e. Determinación de EtG en pelo con productos cosméticos (Martins *et al.*, 2012) <sup>(136)</sup>.

---

Con referencia a la metodología analítica utilizada para la determinación de EtG en sangre, orina y pelo, existe una variedad importante de publicaciones, donde la idea principal es utilizar un instrumento analítico de gran sensibilidad para reducir el valor de la máxima cantidad identificable o *Limit of Detection* (LOD) y reducir el valor de la máxima concentración cuantificable o *Limit of Quantification* (LOQ), también conocida como *Lower Limit of Quantification* (LLOQ). Algunos de los procesos analíticos más utilizados, durante el último siglo, se describen a continuación:

- a. En suero, se realizó una dilución y una derivatización antes del análisis con un cromatógrafo de gases, obteniendo un LLOQ de 0,17 mg/L (Janda and Alt, 2001) <sup>(125)</sup>.
- b. En orina, se realizó una dilución y una derivatización antes del análisis con un cromatógrafo de gases, obteniendo un LLOQ de 0,56 mg/L (Janda and Alt, 2001) <sup>(125)</sup>.
- c. En sangre, se realizó una extracción en fase sólida con cartuchos de aminopropil antes del análisis con un cromatógrafo líquido, obteniendo un LLOQ de 0,15 mg/L (Schloegl *et al.*, 2006) <sup>(128)</sup>.
- d. En orina, se realizó una extracción en fase sólida con cartuchos de aminopropil antes del análisis con un cromatógrafo líquido, obteniendo un LLOQ de 0,15 mg/L (Schloegl *et al.*, 2006) <sup>(128)</sup>.
- e. En pelo, se realizó ultrasonificación, incubación, evaporación y derivatización antes del análisis con un cromatógrafo de gases, obteniendo un LLOQ de 50 pg/mg (Jurado *et al.*, 2004) <sup>(132)</sup>.
- f. En pelo, se realizó ultrasonificación, incubación, evaporación y derivatización antes del análisis con un cromatógrafo líquido, obteniendo un LLOQ de 3 pg/mg (Morini *et al.*, 2006) <sup>(137)</sup>.

El estudio descrito anteriormente, donde se comprobó los parámetros fisicoquímicos que permiten la formación de EtG, demostró que la determinación por la técnica de la electroforesis capilar tenía un LOD de 0,1 µg/mL en suero (Krivánková *et al.*, 2004) <sup>(138)</sup>.

También existen estudios de interés forense, en los que la determinación de EtG se realizó en muestras alternativas: grasa, músculo, costilla, hígado y bilis (Schloegl *et al.*, 2006) <sup>(139)</sup> o en humor vítreo (Thierauf *et al.*, 2011) <sup>(140)</sup>.

---

Inclusive hay estudios experimentales donde se ha podido determinar el EtG después de la absorción del etanol por exposición dermal de productos sanitarios <sup>(141)</sup> o por el consumo oral de productos sanitarios <sup>(142)</sup>

---

## OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN
2. HIPOTESIS
3. OBJETIVO GENERAL
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

---

## **JUSTIFICACIÓN**

El consumo abusivo de alcohol (etanol) está relacionado con diferentes factores de interés médico-legal:

- Riesgo social por alteraciones conductuales.
- Patología psicosomática (dependencia alcohólica y alteraciones orgánicas).
- Impacto forense (imputabilidad penal, repercusiones civiles,...)

Por lo tanto, la determinación de metabolitos del etanol en cadáveres es una buena estrategia para la valoración forense del consumo de alcohol. Conocer las relaciones entre metabolitos y alcoholemia es una herramienta para realizar inferencias médico – legales con relación a la ingesta de alcohol.

## **HIPOTESIS**

El consumo abusivo de alcohol se confirma cuando en el cadáver los resultados analíticos son positivos para alcoholemia y metabolitos del etanol.

## **OBJETIVO GENERAL**

Comprobar que el consumo abusivo de alcohol se puede diferenciar entre agudo o crónico, relacionando alcoholemia, niveles de etilglucurónido y el diagnóstico hepático, en muestras forenses del IAF-Madrid.

---

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Valorar el consumo agudo de alcohol utilizando la alcoholemia, cuantificada por cromatografía de gases con un detector de ionización de la llama y acoplado a un automuestreador de espacio en cabeza.
2. Valorar el consumo agudo o crónico de alcohol utilizando los niveles de etilglucurónido en sangre, orina y pelo, tras su determinación por cromatografía líquida acoplado a un detector de masas en tándem.
3. Analizar las relaciones entre alcoholemia y etilglucurónido en sangre, orina y pelo como estrategia para la valoración del consumo agudo o crónico de alcohol.
4. Relacionar alcoholemia y etilglucurónido con las circunstancias de la muerte para aumentar los criterios de la valoración del consumo de alcohol.
5. Analizar las relaciones entre alcoholemia, niveles de etilglucurónido y diagnóstico hepático como estrategia para diferenciar el consumo agudo del consumo crónico de alcohol.

---

## MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL
2. POBLACIÓN DE ESTUDIO O CASOS SELECCIONADOS
3. MUESTRA DEL ESTUDIO O CASOS ANALIZADOS
4. RECOGIDA DE MUESTRAS
5. DETERMINACIÓN DE LA ALCOHOLEMIA
6. DETERMINACIÓN DE ETILGLUCURONIDO
7. DIAGNOSTICO HEPÁTICO
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El diseño experimental contó con la aprobación de la Comisión Deontológica del Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Madrid, cumpliendo con las disposiciones y normativas de la Bioética para el trabajo con muestras forenses de cadáveres judiciales.

Se mantuvo el anonimato de las muestras, trabajando con un código para cada una de ellas.

Las condiciones para el trabajo en el Instituto Anatómico Forense de Madrid (IAF-Madrid), se coordinaron con su director y fueron:

- i. La asistencia a las diferentes autopsias judiciales fue autorizada por el médico forense de la guardia del juzgado de del juzgado de instrucción.
- ii. El acceso a los archivos del IAF – Madrid fue supervisado por algún funcionario de la administración del instituto.
- iii. El trabajo en el laboratorio de toxicología y bioquímica del IAF-Madrid fue coordinado con los analistas del laboratorio.

Las recomendaciones para recoger las muestras biológicas provenientes de casos o autopsias judiciales, se coordinaron con los médicos forenses (MMFF) de los Juzgados de Instrucción de Madrid (JUZGADOS) y fueron:

- i. Solo se recogieron muestras forenses de aquellos casos o autopsias judiciales de interés para el estudio experimental.
- ii. Solo los MMFF interesados en el estudio permitieron la recogida de las muestras biológicas. Es importante resaltar que el número de MMFF aumentó durante el periodo de recogida de las muestras.
- iii. Solo los MMFF o sus ayudantes eran los responsables de la recogida de las muestras biológicas, según técnicas que se detallan más adelante.



---

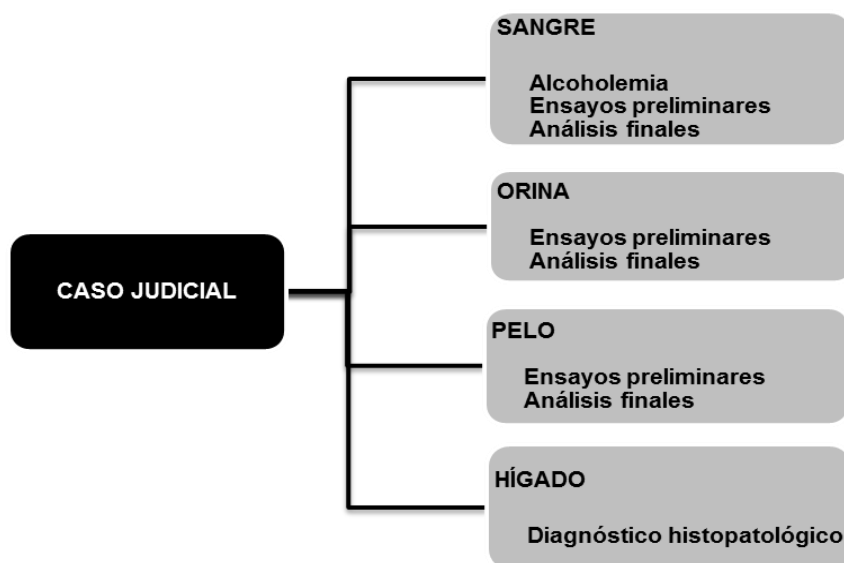
Los casos o autopsias judiciales presentaron características que se relacionaron con el consumo o el no consumo de bebidas alcohólicas. Estas características fueron identificadas a partir de:

- i. La circunstancia de la muerte.
- ii. Las características físicas del cadáver.
- iii. Los hallazgos macroscópicos en el cadáver.
- iv. Los datos del informe del médico forense, del informe clínico u hospitalario del cadáver o del informe del departamento de trabajo social (DTS) del IAF-Madrid.

La recogida de las muestras forenses dependió de la característica del caso o autopsia judicial, por lo que el número de muestras no fue siempre el mismo. Las muestras que se pudieron recoger, según el caso, fueron:

- i. Sangre
- ii. Orina
- iii. Pelo
- iv. Hígado

La distribución de la muestra forense recogida y del análisis a realizar, según la característica del caso o autopsia judicial, como se describe en la figura 26.



**Figura 26:** Relación entre caso judicial, muestra forense recogida y tipo de análisis a realizar.

---

La alcoholemia se determinó en el laboratorio de toxicología y bioquímica del IAF-Madrid, utilizando un cromatógrafo de gases (GC) con un detector de ionización de llama (FID) acoplado con un auto-muestreador de espacio en cabeza (HS), según metodología que se detalla más adelante (Ver determinación de la Alcoholemia).

Los ensayos preliminares y los ensayos finales para la determinación de etilglucurónido (EtG) se realizaron en el laboratorio de toxicología y bioquímica del IAF-Madrid, utilizando un cromatógrafo líquido (LC) acoplado a un espectrómetro de masas en tandem (MS/MS).

Se utilizó agua y algunas muestras forenses en los ensayos preliminares para definir la metodología analítica que se utilizó durante los ensayos finales, donde solo se analizaron las muestras forenses seleccionadas para la determinación de EtG. Todos los detalles se describen más adelante (Ver determinación de EtG).

Los resultados del diagnóstico hepático fueron recogidos de los ensayos realizados en el laboratorio de anatomía patológica del IAF-Madrid y obtenidos en el laboratorio de anatomía patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSC). Los detalles se describen más adelante (Ver diagnostico hepático).

La descripción del diseño experimental desarrollado, describiendo el tipo de actividad realizada y el tiempo utilizado para dicha actividad, se detallan en la siguiente tabla:

DISEÑO EXPERIMENTAL				
ACTIVIDAD	DURACIÓN: Diciembre 2010 – Octubre 2015			DESCRIPCIÓN
Recogida de muestras.	27 meses			Hasta obtener todas las muestras.
Determinación de la alcoholemia.		20 meses		Después de los 7 primeros meses de la recogida.
Ensayos preliminares para EtG.			5 meses	Después de la determinación de la Alcoholemia.
Ensayos finales para EtG.			5 meses	Después de los ensayos preliminares.
Diagnóstico histopatológico.		15 meses (IAF – Madrid)	5 meses (HCSC)	Hasta obtener todos los diagnósticos.
Análisis estadístico.			2 meses	Hasta obtener todas las relaciones estadísticas.

**Tabla1:** Descripción detallada del diseño experimental.

ESTADÍSTICA DEL LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DEL IAF - MADRID						
AÑO	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Autopsias totales en el IAF - Madrid	2283	2227	2103	2139	2020	2079
Casos totales en el IAF - Madrid	2283	2227	2103	2139	2020	2079
Casos de autopsias analizados en el laboratorio	345	330	243	239	260	183
Muestras de autopsias analizadas en el laboratorio	464	4078	356	355	355	319

**Tabla 2:** Relación entre número de autopsias, número de casos y número de muestras judiciales (años 2009 – 2014).

---

## **2. POBLACIÓN DE ESTUDIO O CASOS SELECCIONADOS.**

Se consideró como la población de este estudio, a todos los casos o autopsias judiciales donde las circunstancias de la muerte se relacionaron con el consumo de bebidas alcohólicas. La población estuvo formada por 208 casos judiciales (N=208), todos ellos autopsiados en el IAF-Madrid, entre diciembre del 2010 y febrero del 2013.

Se finalizó la inclusión de casos judiciales en el diseño experimental, cuando se alcanzó aproximadamente el 10% del total de autopsias judiciales que se realizan por año, valor calculado a partir de la estadística del laboratorio de toxicología y bioquímica del IAF – Madrid durante el periodo 2009 – 2014 <sup>(143)</sup>, como se describe en la tabla 2.

Cada caso seleccionado como parte de la población se relacionó con una autopsia judicial, pero a partir de cada autopsia se recogieron una cantidad o número de muestras forenses diferentes, esto debido a las circunstancias de la muerte. Esta relación heterogénea también se identificó en el IAF – Madrid, después de analizar los datos de la tabla 2.

### **2.1. Criterios de los casos seleccionados.**

Los 208 casos o autopsias judiciales seleccionadas cumplieron con los siguientes criterios para su inclusión en la investigación:

- a. La selección de cada caso fue personalizada. El investigador estuvo presente durante cada autopsia judicial.
- b. El responsable de la autopsia judicial fue alguno de los MMFF que colaboraban con este estudio experimental.
- c. La etiología de la muerte estaba relacionada con el consumo de bebidas alcohólicas.
- d. La causa fundamental de la muerte estaba relacionada con el consumo de bebidas alcohólicas.
- e. Los indicios encontrados por el médico forense estaban relacionados con el consumo de bebidas alcohólicas.
- f. Los datos recopilados por el DTS del IAF-Madrid estaban relacionados con el consumo de bebidas alcohólicas.

- 
- g. También se incluyeron los casos donde se descartó el consumo de bebidas alcohólicas en el cadáver.

## **2.2. Datos generales de los casos seleccionados.**

Durante la recopilación de todos los datos, se guardó el anonimato de cada individuo al que se le practicó la autopsia judicial. Los datos de la autopsia de los 208 casos seleccionados, se recopilaron de los archivos del IAF – Madrid y fueron:

- a. Sexo.
- b. Edad.
- c. Data de la muerte.
- d. Etiología de la muerte.
- e. Causa fundamental de la muerte.
- f. Causa inmediata de la muerte.
- g. Antecedentes y dependencias de sustancias psicoactivas.
- h. Llegada del cadáver de un hospital.
- i. Resultados del diagnóstico histopatológico del hígado.

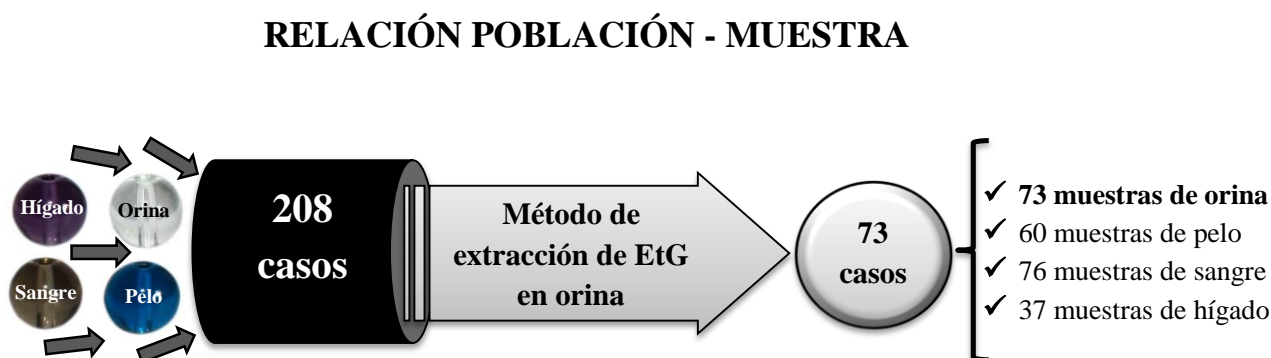
La cantidad de muestras forenses recogidas de los casos seleccionados, considerados como población de este estudio experimental fueron:

- a. 199 muestras de sangre.
- b. **73 muestras de orina.**
- c. 132 muestras de pelo.
- d. 96 muestras de hígado.

### 3. MUESTRA DEL ESTUDIO O CASOS ANALIZADOS.

Se consideró como la muestra de este estudio experimental, a todos los casos cuyas muestras forenses permitieron evaluar la relación entre la cantidad de EtG, la alcoholemia y el diagnóstico histopatológico del individuo.

La muestra estuvo formada por los 73 casos ( $n=73$ ), cada caso tenía características propias y se pudo recoger un número de muestras, según las circunstancias de la autopsia judicial. Estos casos fueron llamados casos analizados y su relación con la población se describe en la siguiente figura:



**Figura 27:** Gráfico de la relación entre población ( $N=208$  casos) y muestra ( $n=73$  casos).

El criterio para seleccionar los 73 casos analizados, a partir de la población, fue el método utilizado para la extracción de EtG, este método estaba indicado para trabajar en muestras de orina <sup>(144)</sup> (Ver determinación de EtG).

Todos los casos, proporcionaron las muestras forenses que fueron utilizadas para la determinación de la alcoholemia, los ensayos preliminares de EtG, los ensayos finales de EtG y el diagnóstico hepático.

En las siguientes tablas (3 - 7), se detallan las principales características de los 73 casos forenses que fueron seleccionados como la muestra de este diseño experimental:

SEXO	
HOMBRE	MUJER
59 casos	14 casos
80,82%	19,18%

**Tabla 3:** Total de casos analizados distribuidos según el sexo

EDAD (años)							
<18	18 – 30	31 – 40	41 – 50	51 – 60	61 – 70	>70	DESCONOCIDO
0 casos	2 casos	12 casos	24 casos	15 casos	10 casos	8 casos	2 casos
0,00 %	2,74 %	16,44 %	32,87 %	20,55 %	13,70 %	10,96 %	2,74 %

**Tabla 4:** Total de casos analizados distribuidos según la edad

ETIOLOGÍA DE LA MUERTE (tipo)				
ACCIDENTAL	HOMICIDIO	INDETERMINADA	NATURAL	SUICIDIO
14 casos	1 caso	3 casos	39 casos	16 casos
19,18 %	1,37 %	4,11 %	53,42 %	21,92 %

**Tabla 5:** Total de casos analizados distribuidos según la etiología de la muerte



TIEMPO DE RECOGIDA DE MUESTRA (horas)						
<12	12 – 24	25 – 36	37 – 48	49 – 60	61 – 72	>72
15 casos	27 casos	20 casos	3 casos	4 casos	1 caso	3 casos
20,55 %	36,99 %	27,39 %	4,11 %	5,48 %	1,37 %	4,11 %

**Tabla 6:** Total de casos analizados distribuidos según el tiempo de recogida de la muestra

DEPENDENCIA A SUSTANCIAS PSICOACTIVAS		
ALCOHOL	OTRO PSICOACTIVO	DESCONOCIDO
19 casos	46 casos	8 casos
26,03%	63,01%	10,96%

**Tabla 7:** Total de casos analizados distribuidos según el tipo de dependencia

### 3.1. Datos específicos de los casos analizados.

La información específica de los casos analizados corresponde a los detalles de las muestras que fueron recogidas a partir de los 73 casos incluidos en la muestra de este estudio experimental.

Como ya lo hemos mencionado, a partir de estos casos se obtuvieron un número de muestras forenses que dependió de las características de la autopsia judicial y también, que la orina fue la muestra limitante de la población y que en la muestra fue la que limitó el número de casos.

---

Según la relación entre un tipo de muestra y el caso forense, se encontró la siguiente relación (figura 27):

- a. 73 muestras de orina, recogidas de 73 casos.
- b. 60 muestras de pelo, recogidas de 60 casos.
- c. 76 muestras de sangre, recogidas de 71 casos.
- d. 37 muestras de hígado, recogidas de 37 casos.

En el caso de las muestras de sangre, se identificaron 5 casos especiales. Estos casos fueron especiales porque durante cada autopsia judicial, se recomendó la recogida de sangre de la zona cardiaca (C) y de la zona encefálica (E).

Según la relación entre el caso y el número de muestras forenses que se pudo recoger, durante la autopsia judicial, se encontraron las siguientes relaciones:

- a. 71 casos con sangre y orina.
- b. 37 casos con sangre, orina e hígado.
- c. 59 casos con sangre, orina y pelo.
- d. 33 casos con sangre, orina, pelo e hígado.
- e. 33 casos con pelo e hígado.

---

## **4. RECOGIDA DE MUESTRAS.**

### **4.1. Criterios para la recogida de muestras.**

Aunque cada autopsia judicial tuvo características propias y únicas, durante la recogida de muestras de los casos analizados se cumplió con los siguientes criterios:

- a. Cuando el médico forense lo autorizó y el caso lo permitió, siempre se recogió sangre, orina y pelo.
- b. Cuando el médico forense no necesitó del diagnóstico histopatológico del hígado, se recogió una muestra de hígado para solicitar el diagnóstico.

### **4.2. Procedimiento para la recogida de muestras.**

El procedimiento para la recogida de muestras procedentes de cadáveres está normalizado por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF), por lo que los protocolos para la recogida de muestras en el IAF-Madrid cumplen con las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el INTCF <sup>(145)</sup>. Como todas las muestras son parte de una investigación forense relacionada con un caso judicial, todas ellas son recogidas por el médico forense o sus ayudantes, en presencia del mismo, bajo sus indicaciones y supervisión.

Durante todo el procedimiento se cumplieron las indicaciones de la Norma Técnica de Prevención 376 (NTP 376) <sup>(146)</sup>, también se cumplió con las recomendaciones de la normativa del INTCF <sup>(27)</sup> y con las disposiciones médico – legales a cumplir durante las autopsias judiciales.

La principal indicación, recomendación y disposición que se cumplió, fue considerar a todas las muestras recogidas como parte de un estudio toxicológico post mórtem.

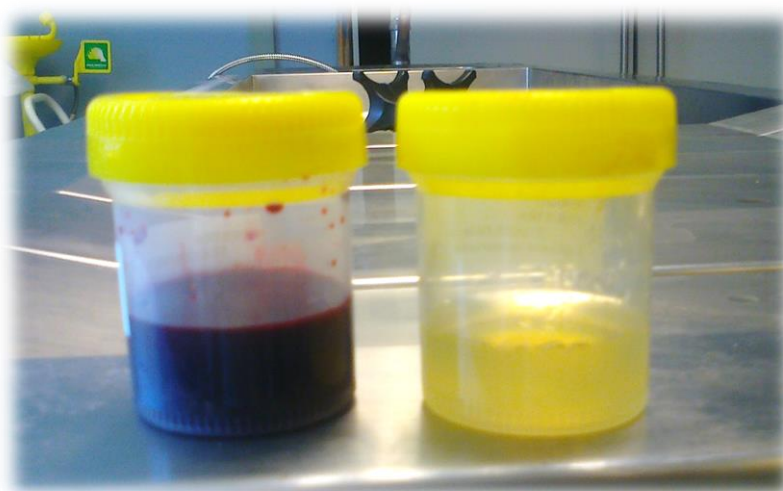
---

#### 4.2.1. Recogida de sangre.

Durante la recogida de sangre, se cumplió con las siguientes recomendaciones y disposiciones específicas:

- ✓ La muestra de sangre se recogió de la zona venosa periférica o de la cavidad cardiaca, de la aurícula derecha.
- ✓ Siempre se utilizó material estéril y de un solo uso.
- ✓ Para la recogida de sangre se utilizó una disolución de fluoruro de potasio (KF) al 1% como conservante. Esta disolución se preparó utilizando agua para LC-MS y KF al 98% Panreac<sup>®</sup> PRS.
- ✓ Después de la apertura del tórax, utilizando cualquiera de las técnicas de aperturas usuales y admitidas en la práctica forense, se abrió el pericardio parietal y, tras exponer la superficie de la aurícula derecha, se procedió a recoger una muestra de sangre de esta cavidad.
- ✓ La toma de la sangre se realizó por punción y aspiración utilizando jeringas de 5 mL, 10 mL o 20 mL y agujas Braun<sup>®</sup> de 0,80 x 40 mm.
- ✓ También se recogió sangre por incisión y posterior aspiración, utilizando bisturís y pipetas pasteur de 3 mL.
- ✓ Los envases utilizados durante la recogida de muestras fueron frascos de 60 mL con tapa rosca y de seguridad (figura28).
- ✓ La cantidad de muestra recogida fue como mínimo de 15 mL, pero siempre que fue posible, el volumen recogido alcanzó la cantidad máxima del envase destinado para la recogida.
- ✓ Cuando las características de la autopsia judicial no permitieron la recogida de sangre de la cavidad cardiaca, con la autorización del médico forense, se recogió por aspiración la muestra de la cavidad craneal. En esta circunstancia los envases fueron tubos Deltalab<sup>®</sup>, K<sub>3</sub> EDTA de 4 mL con una dimensión de 15 x 50 mm o tubos de 12 mL con tapa rosca redonda y faldón tapado con una dimensión de 15 x 102 mm.
- ✓ Posteriormente, en el laboratorio de toxicología y bioquímica del IAF-Madrid y dentro de una campana o vitrina de gases para laboratorio Indelab<sup>®</sup>, las muestras recogidas fueron distribuidas equitativamente, en tubos de plástico de 12 mL con tapa rosca redonda y faldón tapado con una dimensión de 15 x 102 mm, para ser utilizadas en los ensayos analíticos correspondientes.

- 
- ✓ Las 76 muestras de sangre recogidas fueron distribuidas equitativamente en 3 grupos:
    - a. Una tercera parte de la muestra se congeló a una temperatura de  $-22^{\circ}\text{C}$  para ser utilizada en la determinación de la Alcholeemia.
    - b. Otra tercera parte de la muestra se congeló a una temperatura de  $-22^{\circ}\text{C}$  para ser utilizada en los ensayos preliminares
    - c. La última tercera parte de la muestra se congeló a la misma temperatura indicada para ser utilizada en los análisis finales.



**Figura 28:** Sangre y orina posterior a su respectiva recogida, envasado con KF 0,1%

#### 4.2.2. Recogida de orina.

Durante la recogida de orina, se cumplió con las siguientes recomendaciones y disposiciones específicas:

- ✓ La muestra de orina se recogió de la zona la superficie o cúpula de la vejiga.
- ✓ Siempre se utilizó material estéril y de un solo uso.
- ✓ Para la recogida de orina se utilizó una disolución de KF al 1% como conservante, que fue preparada con agua para LC-MS y KF al 98% Panreac<sup>®</sup> PRS.
- ✓ Durante la inspección médico – legal de la cavidad abdominal, se expuso la zona para la recogida de la orina y después de secarla convenientemente, se recogió el contenido

---

urinario por punción y aspiración, utilizando jeringas de 5 mL, 10 mL o 20 mL y agujas de 0,80 x 40 mm.

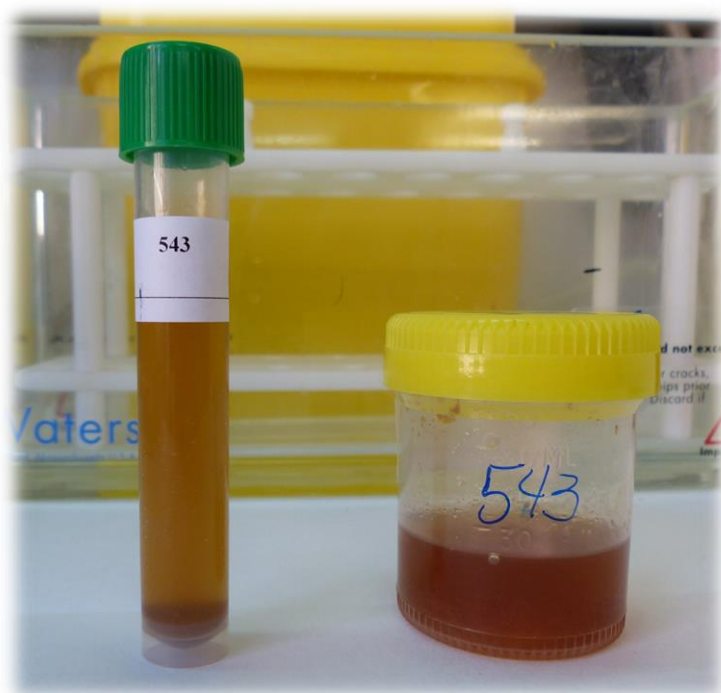
- ✓ Cuando el procedimiento anterior no fue posible, la recogida de orina se realizó por incisión y aspiración utilizando bisturís y pipetas pasteur de 3 mL.
- ✓ Se recogió toda la cantidad disponible de orina y cuando fue posible, se alcanzó el volumen máximo del envase de recogida. Se utilizaron frascos Deltalab<sup>®</sup> de 60 mL con tapa rosca, amarilla y de seguridad o tubos de plástico de 12 mL con tapa rosca redonda y faldón tapado con una dimensión de 15 x 102 mm .
- ✓ Cuando el volumen de la muestra lo permitió, en el laboratorio de toxicología y bioquímica del IAF-Madrid y dentro de una campana o vitrina de gases para laboratorio Indelab<sup>®</sup>, las muestras recogidas fueron distribuidas equitativamente en tubos de plástico de 12 mL con tapa rosca redonda y faldón tapado con una dimensión de 15 x 102 mm, para ser utilizadas en los ensayos analíticos correspondientes (figura29).
- ✓ Las 73 muestras de orina recogidas fueron distribuidas equitativamente en 2 grupos:
  - a. La mitad de la muestra se congeló a una temperatura de -22°C para ser utilizada en los ensayos preliminares.
  - b. La otra mitad de la muestra se congeló a la misma temperatura indicada para ser utilizada en los análisis finales.

#### **4.2.3. Recogida de pelo.**

Durante la recogida de pelo, se cumplió con las siguientes recomendaciones y disposiciones específicas:

- ✓ Después de ser autorizados por el médico forense, se recogió un mechón de cabello. La recogida del cabello se realizó de acuerdo a las normas que sobre la misma publicó la *Society International of Hair Testing* (SOHT) <sup>(51,147)</sup>.
- ✓ El mechón de pelo fue cortado, con una tijera estéril, de la zona occipital y muy próxima al cuero cabelludo.
- ✓ Durante la recogida de pelo no se utilizó conservante o aditivo para el almacenamiento de la muestra. (figura 30)
- ✓ Las 60 muestras de pelo se distribuyeron en 2 grupos:

- 
- a. La mitad de la muestra se refrigeró a una temperatura de 5°C para ser utilizada en los ensayos preliminares
  - b. La otra mitad de la muestra se refrigeró a la misma temperatura indicada para ser utilizada en los análisis finales



**Figura 29:** Muestra de orina recogida y distribuida en tubos de plástico para su congelación.



**Figura 30:** Muestras de pelo, recogidas y listas para su refrigeración.

#### 4.2.4. Recogida de hígado.

Durante la recogida de hígado, se cumplió con las siguientes disposiciones específicas:

- ✓ Durante cada autopsia judicial y según sus características, el médico forense recogió una cuña de hígado para su diagnóstico histopatológico. Este diagnóstico se realizó en el laboratorio de anatomía patológica del IAF – Madrid
- ✓ En los casos donde el médico no necesitó del diagnóstico histopatológico y después de su autorización, se recogió una muestra de hígado para su diagnóstico en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid.
- ✓ Para la recogida de hígado, se utilizó como fijador formaldehído al 4% Panreac®, tamponado a pH 7, estabilizado con metanol y para diagnóstico clínico (figura 31).
- ✓ La muestra recogida tuvo una dimensión aproximada de 2 centímetros de grosor aproximado, estuvo alejada de grandes vasos y de la vía biliar.
- ✓ Las 41 muestras de hígado se distribuyeron en 2 grupos:
  - a. 5 muestras de hígado para el diagnóstico en el laboratorio de anatomía patológica del IAF – Madrid.
  - b. 36 muestras de hígado para el diagnóstico en el laboratorio de anatomía patológica en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid.



**Figura 31:** Muestras de hígado y su respectivo envase con formaldehído 4% (pH = 7).



---

## 5. DETERMINACIÓN DE LA ALCOHOLEMIA.

En el desarrollo de la determinación de la Alcholeemia se cumplió con las indicaciones de la (NTP 376) <sup>(28)</sup> y con las indicaciones del Consejo Superior de Investigaciones Científicas <sup>(148)</sup> para las buenas prácticas de laboratorio.

La determinación de la alcholeemia o cantidad de etanol por litro de sangre, en cadáveres judiciales, se realizó en las 76 muestras de sangre recogidas de los casos analizados y distribuidas para este ensayo analítico. Cada muestra fue analizada por duplicado.

También se identificaron y cuantificaron otras sustancias volátiles presentes en la misma muestra.

### 5.1. Protocolo analítico.

Existen protocolos o metodologías que permiten conocer la concentración de alcohol en sangre <sup>(33)</sup> o el consumo agudo de alcohol <sup>(149)</sup>. Estas metodologías se fundamentan en la identificación y cuantificación del etanol.

Para cuantificar los gramos de etanol y los gramos de otros volátiles por litro de sangre, se desarrolló el siguiente protocolo analítico:

#### A. Instrumento analítico.

Se utilizó un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama y acoplado a un auto-muestreador de espacio en cabeza (HS – GC – FID), formado por:

- ✓ Cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama Perkin Elmer<sup>®</sup> AutoSystem XL.
- ✓ Auto-muestreador de espacio en cabeza Perkin Elmer<sup>®</sup> HS 40.
- ✓ Columna cromatográfica Zebron<sup>®</sup> ZB-BAC-2 Capillary GC Column, con unas dimensiones de 30m x 0,32mm x 1,2µm <sup>(150)</sup>.

- ✓ Aire con 20,9% de O<sub>2</sub> de Carburos Metálicos<sup>®</sup> como comburente para el detector.
- ✓ Hidrógeno al 99,9992% de pureza de Carburos Metálicos<sup>®</sup> como combustible para el detector.
- ✓ Helio al 99,9992% de pureza de Carburos Metálicos<sup>®</sup> como gas portador o fase móvil.

Para el análisis de cada muestra de sangre, los parámetros fueron constantes en el instrumento analítico y son detallados en la siguiente tabla:

HS – GC – FID	
Temperatura del HS	100°C
Temperatura del FID	220°C
Temperatura del horno	37°C
Flujo del aire	450 mL/min
Flujo del hidrógeno	45 mL/min
Flujo del helio	25 mL/min
Tiempo de retención (RT)	Cada sustancia tiene su RT
Tiempo total del análisis	10 min

**Tabla 8:** Tabla de los parámetros analíticos del cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama y acoplado a un auto-muestreador de espacio en cabeza

## B. Disoluciones estándares.

Antes de analizar las muestras forenses, se prepararon diferentes disoluciones que se utilizaron en la preparación de las muestras controles, estas se llamaron disoluciones estándares. Todas fueron preparadas en una campana o vitrina de gases para laboratorio Indelab<sup>®</sup>.

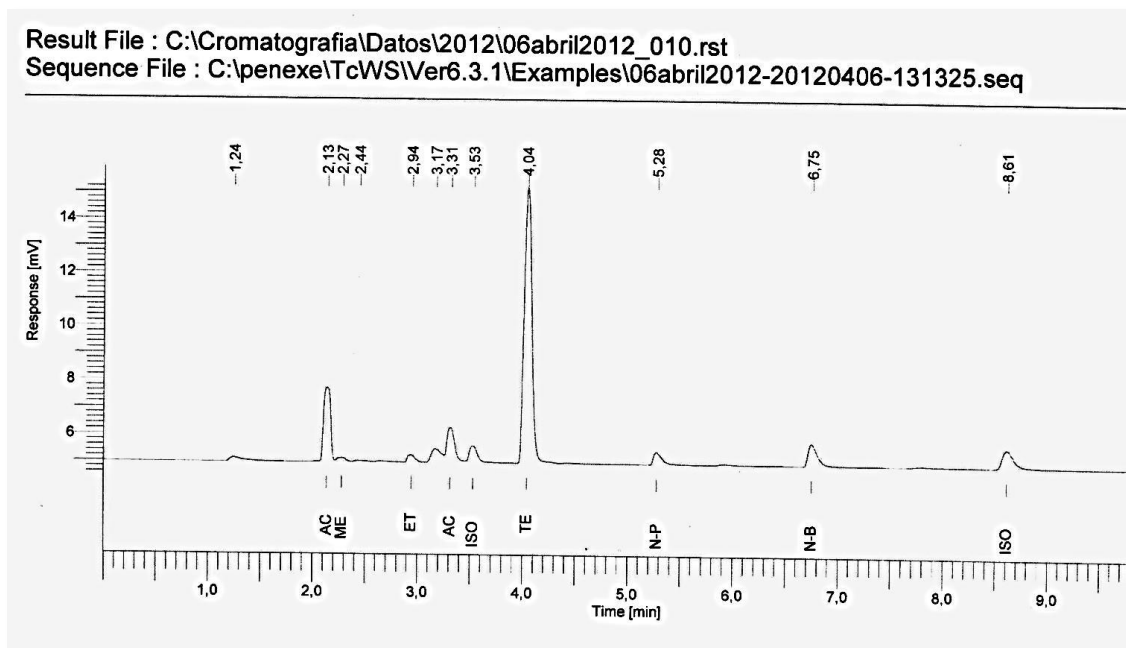
---

Las disoluciones estándares para la determinación de la Alcholeemia, utilizadas para diseñar las rectas de calibración, se prepararon como se detalla a continuación:

- ✓ Se prepararon disoluciones con las siguientes sustancias volátiles <sup>(136)</sup>:
  - a. Etanol absoluto, PAI, ACS.
  - b. Metanol al 99,9%, PAI, ACS.
  - c. Acetaldehído al 99%, para síntesis.
  - d. Acetona al 99,9%, PAI, ACS.
  - e. Isopropanol al 99,9%, PAI, ACS.
  - f. n-propanol al 99,5%, para síntesis.
  - g. Isobutanol al 99%, para análisis ACS
  - h. n- butanol al 99,5%, para análisis ACS, ISO.
- ✓ Para cada sustancia volátil, se prepararon 6 disoluciones mezclando cada sustancia volátil y agua, hasta alcanzar las siguientes concentraciones: [0,00g/L], [0,25g/L], [0,75g/L], [1,25g/L], [1,50g/L] y [2,00g/L].
- ✓ Para las disoluciones de concentración [0,00g/L], se reemplazó la sustancia volátil por agua.
- ✓ Se preparó una disolución con una concentración de [1g/L] de ter-butanol, para ser utilizada como estándar interno ( $St_{int}$ ).
- ✓ Para controlar las mediciones de etanol, se utilizaron controles de Abbot Laboratories<sup>®</sup>, REA Etanol Whole Blood controls <sup>(151)</sup>, con las siguientes concentraciones: [0,50g/L], [1,00g/L] y [1,50g/L] de etanol.

Cada sustancia volátil fue identificada por un pico cromatográfico específico, sin solapamiento entre los picos y con un tiempo de retención o Retention Time (RT) característico.

Como se muestra en la figura 32, el acetaldehído (AC) fue identificado a los 2,13 minutos, el metanol (ME) a 2,27 minutos, el etanol (ET) a 2,94 minutos, la acetona (AC) a 3,31, el isopropanol (ISOP) a 3,55 minutos, el n-propanol (N-P) a 5,26 minutos, el n-butanol (N-B) a 6,75, el isobutanol (ISOB) a 8,61 minutos y el ter-butanol (TE) a 4,04.



**Figura 32:** Cromatograma que muestra cada pico cromatográfico de los volátiles identificados después del análisis por HS – GC- FID.

### C. Muestras controles.

Después de la preparación de todas las disoluciones estándares, se prepararon las muestras patrones. Estas muestras fueron utilizadas como controles de calibración, de linealidad y de sensibilidad del protocolo e instrumento analítico, y se prepararon como se detalla a continuación:

- ✓ Para preparar las muestras patrones utilizadas en las rectas de calibración para etanol, se utilizó un vial de 20 mL para HS con una dimensión de 22 x 75 mm y se mezcló 0,5 mL de disolución de etanol [0,00g/L] y 0,5 mL de la disolución del  $St_{int}$ .
- ✓ Este procedimiento se repitió, por separado, para las 5 disoluciones controles restantes de etanol.
- ✓ El proceso anterior se repitió para preparar las rectas de calibración para metanol, acetaldehído, acetona, isopropanol, n-propanol e isobutanol.
- ✓ Para preparar las muestras patrones utilizadas para controlar la medición de etanol, se utilizó un vial de 20 mL para HS con una dimensión de 22 x 75 mm y se mezcló 0,5mL

de control de etanol [0,50g/L] y 0,5 mL de la disolución del St<sub>int</sub>. El proceso se repitió con los controles de etanol [1,00g/L] y [1,50g/L].

- ✓ Después de cada mezcla, cada vial fue cerrado herméticamente utilizando una capsuladora manual Perkin Elmer®, tapones de goma para vial HS y cápsulas de aluminio para vial HS.
- ✓ El contenido de cada vial fue analizado en el HS–GC–FID cumpliendo una secuencia ascendente según la concentración de cada disolución preparada y utilizando agua como muestra blanco entre muestras patrones.
- ✓ Para comprobar la calibración, la linealidad y sensibilidad del protocolo analítico, el proceso anterior se repitió cada 7 meses, 4 veces en total durante todo el proceso, para la determinación de la alcoholemia.

A continuación se muestran una de las 4 rectas de calibración, utilizadas para cuantificar etanol y acetaldehído en muestras de sangre (tablas 9 y 10) (figuras 33 y 34)

Muestra	[ Etanol ]	Señal	Terbutanol
0	0,00	0,00	
1	0,25	915,45	38332,83
2	0,75	2733,45	38343,47
3	1,25	4985,51	39187,52
4	1,50	5674,50	38381,25
5	2,00	7563,03	38895,57

**Tabla 9:** Relación de la señal cromatográfica y la concentración de etanol, mostrando los valores de las señales del estándar interno.

Muestra	[ Acetaldehído ]	Señal	Terbutanol
0	0,00	0,00	
1	0,25	6253,93	38951,87
2	0,75	18294,35	39761,34
3	1,25	31263,28	39413,18
4	1,50	37329,37	39493,49
5	2,00	49204,09	40170,96

**Tabla 10:** Relación de la señal cromatográfica y la concentración de acetaldehído, mostrando los valores de las señales del estándar interno.

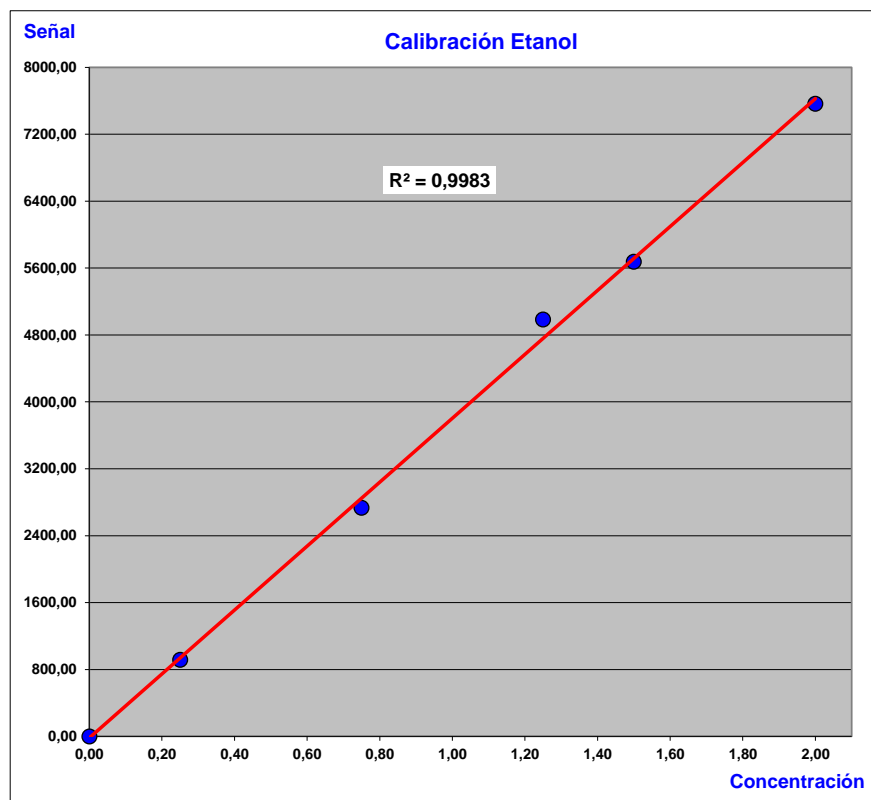


Figura 33: Recta de calibración del etanol, ( $R^2 = 0,9983$ ).

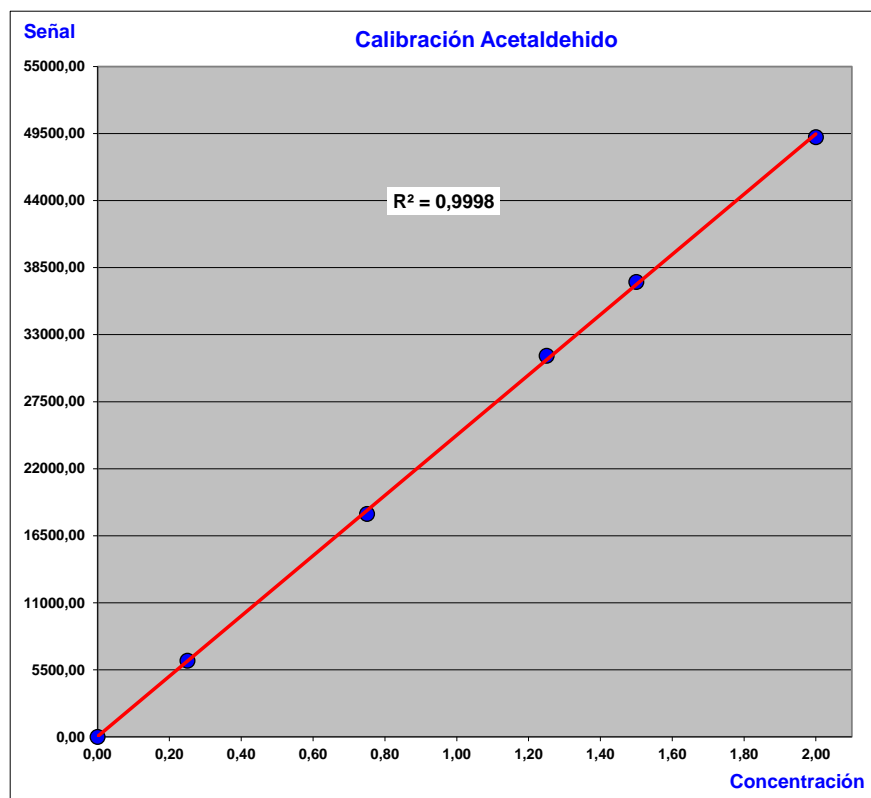


Figura 34: Recta de calibración del acetaldehído, ( $R^2 = 0,9998$ ).

---

#### D. Muestras Forenses.

Después de analizar las muestras patrones, se procedió al análisis de las muestras forenses siguiendo los siguientes procesos:

- ✓ Se descongelaron las muestras guardadas durante 7 meses, aquellas partes de las muestras de sangre que fueron distribuidas para la determinación de la alcoholemia.
- ✓ La descongelación se realizó a temperatura ambiente dentro de una campana o vitrina de gases para laboratorio Indelab<sup>®</sup>.
- ✓ Con la sangre a temperatura ambiente, en un vial de 20 mL para HS con una dimensión de 22 x 75 mm, se mezcló 0,5 mL de sangre y 0,5 mL del St<sub>int</sub>.
- ✓ El vial fue cerrado herméticamente utilizando una capsuladora manual Perkin Elmer<sup>®</sup>, tapones de goma para vial HS y cápsulas de aluminio para vial HS.
- ✓ El proceso anterior se repitió con cada muestra forense.
- ✓ La concentración de etanol y de los otros volátiles en cada muestra de sangre, se calculó utilizando las rectas de calibración respectivas.
- ✓ Cada muestra de sangre fue preparada y analizada por duplicado.

---

## 6. DETERMINACIÓN DE ETILGLUCURONIDO.

En el desarrollo de la determinación de Etilglucuronido se cumplió con las indicaciones de la (NTP 376) <sup>(28)</sup> y con las indicaciones del Consejo Superior de Investigaciones Científicas <sup>(134)</sup> para las buenas prácticas de laboratorio.

La determinación de EtG, en cadáveres judiciales, se realizó en 76 muestras de sangre, 73 muestras de orina y en 60 muestras de pelo. Después de ser recogidas estas muestras se distribuyeron para realizar los ensayos preliminares y los ensayos finales.

Para utilizar con eficiencia los materiales y reactivos del diseño experimental, se procedió a realizar los ensayos preliminares. Posteriormente, con el protocolo analítico definido, se analizaron todas las muestras recogidas y distribuidas para los ensayos finales.

Todos los ensayos preliminares y finales se realizaron en un mismo instrumento analítico.

### 6.1. Instrumento analítico.

La técnica analítica utilizada para la determinación de EtG en sangre, orina y pelo, muestras recogidas de cadáveres judiciales, fue la cromatografía líquida acoplada a un detector de masas en tándem (LC–MS/MS).

Los materiales utilizados para desarrollar esta técnica analítica fueron:

- ✓ Un cromatógrafo líquido Agilent Technologies<sup>®</sup> 1200 Series.
- ✓ Un espectrómetro de masas Applied Biosystem<sup>®</sup> 3200 Q/Trap LC/MS/MS System.
- ✓ El sistema del espectrómetro de masas utilizó un compresor de aire Atlas Copco<sup>®</sup> SF4FF, un generador de nitrógeno (N<sub>2</sub>), Peak<sup>®</sup> Scientific Instrument, modelo NM20Z y una bomba de vacío Agilent Technologies<sup>®</sup> DS 602 605 liters/min.
- ✓ Una columna cromatográfica, ACE<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> HPLC Columns, ACE 5 C18–PFP 5cm x 2,1mm.



---

## 6.2. Ensayos preliminares.

Los ensayos preliminares permitieron adaptar un protocolo analítico para la determinación de EtG en sangre, orina y pelo. Estos ensayos se realizaron tras una revisión bibliográfica y posterior comparación experimental de diferentes técnicas analíticas.

A partir de la revisión de *Politi et al 2007*<sup>(124)</sup>, de la revisión de *Rainio et al 2008*<sup>(80)</sup> y de la revisión de *Crunelle et al 2014*<sup>(152)</sup>, se compararon las siguientes técnicas:

- ✓ La técnica de *Wurst et al 1999*<sup>(153)</sup>, para la determinación de EtG en fluidos biológicos y tejidos post mórtem.
- ✓ La técnica de *Wurst et al 2000*<sup>(154)</sup>, para la determinación de EtG en orina.
- ✓ La técnica de *Schloegl et al 2006*<sup>(125)</sup>, para la determinación de EtG en fluidos biológicos, tejidos y médula de costilla post mórtem.
- ✓ La técnica de *Høiseth et al 2007*<sup>(155)</sup>, para la determinación de EtG en sangre post mórtem.
- ✓ La técnica de *Morini et al 2007*<sup>(129)</sup>, para la determinación de EtG en suero.

También se experimentó con las técnicas utilizadas en el laboratorio del Servicio de Toxicología Forense, del Instituto de Ciencias Forenses Profesor Luis Concheiro, de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Santiago de Compostela (USC):

- ✓ La técnica de *Concheiro et al 2009*<sup>(156)</sup>, para la determinación de EtG en orina y pelo.
- ✓ La técnica propia del laboratorio, para la determinación de EtG en sangre.

Y finalmente, se experimentó con las técnicas recomendadas por 2 casas comerciales:

- ✓ La técnica de Biotage®<sup>(26)</sup> para la determinación de EtG en orina.
- ✓ La técnica de AB Sciex© para la identificación de EtG por LC–MS/MS.

Finalizados los ensayos preliminares y después de la comparación de los resultados obtenidos, se adaptó un protocolo analítico cuyas características generales fueron:

- a. Utilizar con eficiencia los materiales y reactivos de este diseño experimental.
- b. Identificar EtG en sangre, orina o pelo por LC–MS/MS, utilizando el mismo protocolo.
- c. Cuantificar EtG en sangre, orina o pelo por LC–MS/MS, utilizando el mismo protocolo.

### 6.3. Protocolo analítico.

El siguiente protocolo analítico adaptado incluyó las condiciones analíticas para utilizar el LC-MS/MS, la preparación de muestras de calibración, el pretratamiento de todas las muestras y los ensayos o análisis finales de todas las muestras.

#### A. Condiciones analíticas del LC-MS/MS.

Antes de utilizar el instrumento analítico, se prepararon 2 fases móviles en una campana o vitrina de gases para laboratorio Indelab<sup>®</sup> y se fijaron los parámetros instrumentales, como se describe a continuación:

- ✓ La fase móvil A, se preparó mezclando ácido fórmico al 85%, PA y agua para LC-MS, hasta lograr una concentración de 0,1% de ácido fórmico.
- ✓ El pH de la fase móvil A fue medido por triplicado, estimando una media de 3,37.

CROMATÓGRAFO LÍQUIDO	
Presión máxima de la bomba	4000 psi
Temperatura de la columna	40°C constante
Volumen muerto	40 µL
Volumen de inyección	10 µL
Fase móvil A	Acido Fórmico 0,1%
Fase móvil B	Acetonitrilo
Rampa	0,0 min – 4,0 min (100% Fase móvil A) 4,0 min – 5,0 min (100% Fase móvil B) 5,0 min – 6,0 min (100% Fase móvil A)
Flujo	100 µL/min constante
Tiempo total del análisis	6 min

**Tabla 11:** Parámetros para el cromatógrafo líquido.

- ✓ Para la fase móvil B se utilizó acetonitrilo al 99,9%, PAI, ACS y su pH también fue medido por triplicado, estimando una media de 5,36.
- ✓ Para la medición del pH se utilizó un medidor de pH, Crison<sup>®</sup> microPH 2002 serial 3544 que fue calibrado previamente con disoluciones de referencia, Merck Millipore<sup>®</sup> Certipur<sup>®</sup>, solución pH=4,00, solución pH=6,86 y solución pH= 9,18.

ESPECTRÓMETRO DE MASAS EN TANDEM	
Tipo de escaneado	MRM
Duración del escaneado	6 minutos
Periodos por escaneados	353
Tiempo total de escaneado	1,020 segundos
Polaridad	Negativo (-)
Fuente de ion	Turbo spray
Temperatura	500°C
Vacío	3,4 x 10 <sup>-5</sup> torr
Flujo de N <sub>2</sub>	50 psi
EtG 1: Q1 220,94 → Q3 84,90	DP: - 25 V EP: - 12 V CE: - 24 V
EtG 2: Q1 220,94 → Q3 74,90	DP: - 25 V EP: - 12 V CE: - 22 V
EtG-D <sub>5</sub> 1: Q1 226,06 → Q3 85,00	DP: - 30 V EP: - 3 V CE: - 24 V
EtG-D <sub>5</sub> 2: Q1 226,06 → Q3 74,90	DP: - 30 V EP: - 3 V CE: - 26 V

**Tabla 12:** Parámetros para el espectrómetro de masas en tándem.

- 
- ✓ Cada fase móvil fue filtrada utilizando filtros de membrana, Pall<sup>®</sup> Life Sciences, GH Polypro 47mm x 0,45um y una bomba de vacío, KNF<sup>®</sup> Laboport<sup>®</sup> filtration series type N86KN.18.
  - ✓ El cromatógrafo líquido fue acondicionado de forma constante, según los parámetros que se detallan en la tabla 11
  - ✓ Para utilizar el espectrómetro de masas, este se conectó a un generador de nitrógeno Peak<sup>®</sup> Scientific Instrument, modelo NM20Z y este generador, se conectó a un compresor de aire Atlas Copco<sup>®</sup> SF4FF hasta obtener un flujo fijo de nitrógeno (N<sub>2</sub>).
  - ✓ Para mantener el vacío constante en el instrumento se conectó el espectrómetro a una bomba de vacío Agilent Technologies<sup>®</sup> DS 602 605 liters/min.
  - ✓ Durante todos los ensayos, el espectrómetro de masas se programó de forma constante, según las parámetros que se detallan en la tabla 12

## **B. Disoluciones estándares.**

Las disoluciones estándares utilizadas para la determinación de EtG, se prepararon en una campana o vitrina de gases para laboratorio Indelab<sup>®</sup>, según el siguiente proceso:

- ✓ Se preparó una disolución, utilizada como estándar interno (Stint), mezclando el patrón de referencia *ethyl-β-D-glucopyranosiduronic acid – D<sub>5</sub>* (EtG-D<sub>5</sub>) ≥ 99%, Medichem<sup>®</sup> Medidrug<sup>®</sup> con agua para LC-MS. Después se realizaron diluciones hasta obtener una concentración de [5 µg/mL] de Stint.
- ✓ Se prepararon 3 disoluciones, utilizadas como estándar (St) madre, mezclando el patrón de referencia *ethyl-β-D-glucopyranosiduronic acid* (EtG) ≥ 99% de Medichem<sup>®</sup> Medidrug<sup>®</sup> con agua para LC-MS. Después se prepararon las diluciones de EtG hasta obtener concentraciones de [200 µg /mL], [20 µg /mL] y [2 µg /mL].

## **C. Muestras de calibración.**

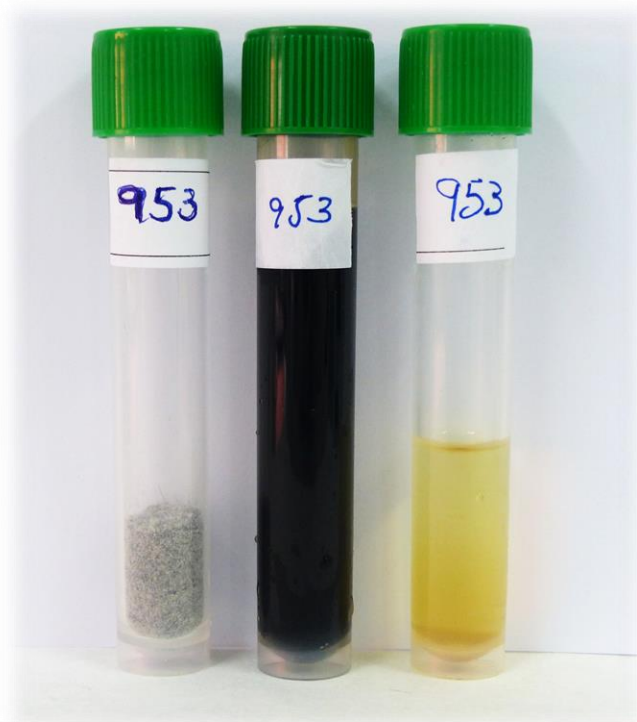
Para controlar la linealidad y sensibilidad del protocolo e instrumento analítico, se prepararon diferentes muestras de calibración, a partir de las respectivas disoluciones estándares, según el siguiente proceso:

- ✓ Las muestras de calibración fueron preparadas para diseñar las rectas de calibración, para cada tipo de muestra forense.

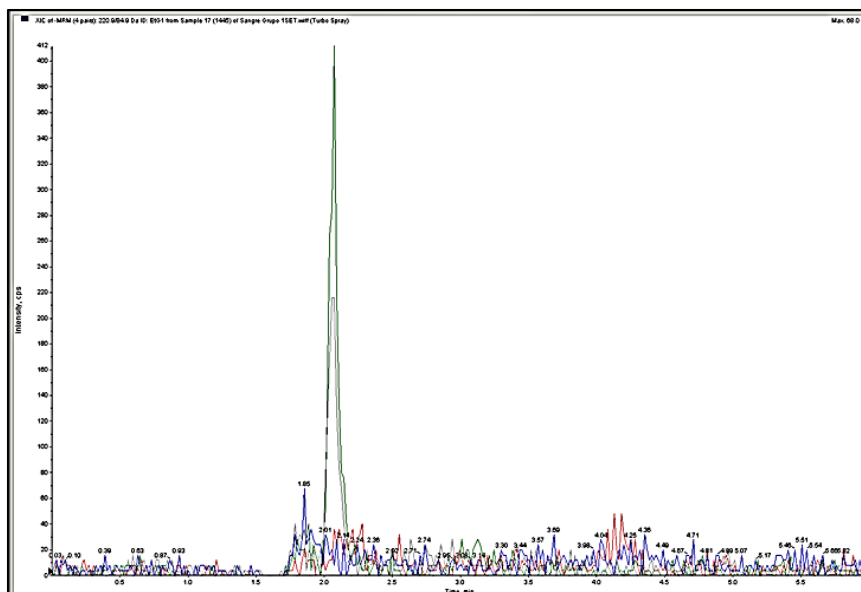
- ✓ Para diseñar cada recta de calibración se utilizaron las muestras recogidas de un mismo caso judicial, caso identificado como negativo para EtG (figura 35), analizando la información recopilada después de la autopsia y los resultados de sus ensayos preliminares (figura 36).
- ✓ Cada recta de calibración se diseñó con 7 muestras de calibración con las siguientes concentraciones: [0µg/mL], [0,5µg/mL], [1µg/mL], [5µg/mL], [10µg/mL], [50µg/mL] y [100µg/mL].
- ✓ En tubos de plástico de 12 mL con tapa rosca redonda y faldón tapado con una dimensión de 15 x 102 mm, se mezclaron la muestra forense respectiva, la dilución de Stint EtG–D5 y la disolución St madre respectiva de [2 µg /mL], [20µg /mL] y [200µg/mL] o agua para LC-MS.
- ✓ Para la preparación de las muestras de calibración, se adaptó la metodología utilizada en el Laboratorio del Servicio de Toxicología Forense, del Instituto de Ciencias Forenses Profesor Luis Concheiro, de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), para la determinación de EtG en sangre mediante LC-MS/MS, según se detalla en la tabla 13.

PREPARACIÓN DE RECTAS DE CALIBRACIÓN							
Disolución Estándar Madre	MUESTRAS DE CALIBRACIÓN DE EtG						
	0µg /mL	0,5µg /mL	1µg /mL	5µg /mL	10µg /mL	50µg /mL	100µg /mL
EtG 200µg/mL						50 µL	100 µL
EtG 20µg/mL				50 µL	100 µL		
EtG 2µg/mL		50 µL	100 µL				
EtG-D5 5µg/mL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Agua	100 µL	50 µL		50 µL		50 µL	
Muestra Forense	200 µL de sangre o 200 µL de orina o 100 mg de pelo						

**Tabla 13:** Volúmenes necesarios para preparar las muestras de calibración para la determinación de etilglucurónido.



**Figura 35:** Muestras de sangre, orina y pelo de un mismo caso, caso negativo para EtG, utilizadas para diseñar las respectivas muestras de calibración.



---

#### D. Pre tratamiento de muestras.

Las 73 muestras de orina, junto a sus muestras de calibración, fueron las primeras en pasar por este proceso, inmediatamente después fueron extraídas y analizadas durante los ensayos finales, como se explica más adelante. Las siguientes muestras fueron las 76 de sangre y finalmente las 60 de pelo, cada tipo de muestra con sus respectivas muestras de calibración.

Para iniciar este proceso, cada grupo de muestras fueron dejadas en una campana o vitrina de gases para laboratorio Indelab<sup>®</sup> hasta alcanzar la temperatura ambiente. Después fueron sometidas al pretratamiento como se indica a continuación:

- ✓ Las muestras líquidas (sangre u orina) fueron homogenizadas, utilizando un baño de ultrasonido Bandelin<sup>®</sup> Sonorex Digitec Typ DT 100, durante 5 minutos.
- ✓ Se recogieron 200 µL de sangre o de orina, con una pipeta automática Labnet<sup>®</sup> Biopette<sup>®</sup> de 100 µL a 1000 µL y puntas azules universales de 100 µL a 1000 µL.
- ✓ Se utilizó 100 mg de pelo, medido en una balanza analítica Sartorius<sup>®</sup> BP211D [0,01mg (80g) 0,1mg (210g)].
- ✓ Para alcanzar el peso indicado, la longitud máxima llegó hasta los 3cm proximales al cuero cabelludo. Esta longitud no fue la misma para cada muestra, porque sus características influyeron en la estimación del peso.
- ✓ Después de alcanzar el peso necesario, cada muestra fue homogenizada con un dispersor IKA<sup>®</sup> ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> T25 basic, probetas de polipropileno y tijeras, hasta lograr el tamaño mínimo que las características de la muestra permitía (figura 37).
- ✓ En tubos de 12 mL, 15 x 102 mm con tapa rosca redonda, se mezcló la cantidad de muestra respectiva con 1800 µL de ACN y 50 µL de Stint. Cada mezcla se agitó durante 10 segundos utilizando un agitador – vortex Heidolph<sup>®</sup>, Reax control de hasta 2500 rpm.
- ✓ Finalizado todo el proceso anterior, se procedió a la extracción de EtG en cada grupo de muestras pre tratadas.



**Figura 37:** Muestra de pelo después de ser homogenizada, hasta lograr su tamaño mínimo.



**Figura 38:** Muestras de calibración de sangre pre tratadas, antes del proceso de extracción por fase solida utilizando columnas BIOTAGE® Evolute® AX-50 100 mg 3mL



## E. Extracción de etilglucuronido.

Finalizado el pre tratamiento de cada grupo de muestras y de sus respectivas muestras de calibración, se procedió a la extracción de EtG como se detalla a continuación:

- ✓ Los reactivos utilizados durante el proceso de extracción fueron:
  - a. Agua para LC-MS.
  - b. Etanol (EtOH) absoluto, PAI, ACS.
  - c. Metanol (MeOH) al 99,9%, PAI, ACS.
  - d. Acetonitrilo (ACN) al 99,9%, PAI, ACS.
  - e. Acido Fórmico (Ac. Form) al 85%, PA.
  - f. Ácido Clorhídrico (HCl) al 37%, RPE. (Reagente di grado analítico)
- ✓ El proceso de extracción se realizó dentro de una campana o vitrina de gases para laboratorio Indelab®, utilizando un sistema de extracción Waters®, Extraction Manifold, 20pos 16 x100mm tubes, conectado a una bomba de vacío Gast® con compresor de diafragma DOA-P504-BN.
- ✓ Durante este proceso se utilizaron columnas de extracción en fase sólida, *solid phase extraction* (SPE), BIOTAGE® Evolute® AX-50 100 mg 3mL SPE Columns (figura38)

EXTRACCIÓN DE ETG	
Columnas de extracción	BIOTAGE® Evolute® AX-50
Acondicionamiento 1 de columna	3 mL de MeOH
Acondicionamiento 2 de columna	3 mL de Agua
Acondicionamiento 3 de columna	3 mL de ACN
Agregar muestra	Cantidad de muestra pre-tratada
Lavado 1 de interferencias	3 mL de ACN
Lavado 2 de interferencias	3 mL de MeOH
Elución	3 mL de disolución HCL 2% en ACN

**Tabla 14:** Procedimiento para la extracción de EtG según BIOTAGE®.

---

La técnica de extracción utilizada fue una adaptación del procedimiento descrito por BIOTAGE<sup>®</sup> (144), como se detalla en la tabla 14.

La adaptación comentada, se fundamentó en el procesamiento realizado a la disolución obtenida o elución, como se detalla a continuación:

- ✓ La elución fue evaporada hasta sequedad utilizando un evaporador Zymark<sup>®</sup> Turbo Vap<sup>®</sup> LV evaporator, una corriente constante de nitrógeno al 99,9992% de pureza de Carburos Metálicos<sup>®</sup> y tubos cónicos para evaporación de 12 mL, 16 x 100mm.
- ✓ Cada elución seca fue reconstituida en los tubos cónicos agregando 250 µL de disolución de ácido fórmico 0,1%.
- ✓ La disolución reconstituida fue trasvasada a un tubo de microcentrífuga de 2mL tipo eppendorf y homogenizada con un agitador – Vortex Heidolph<sup>®</sup>, Reax control de hasta 2500 rpm durante 10 segundos.
- ✓ Después, cada disolución reconstituida y homogenizada fue sedimentada con una centrífuga OrtoAlresa<sup>®</sup> Biocen 20, durante 15 minutos a 14000 rpm.
- ✓ Finalizada la sedimentación se recogió la fase líquida con una pipeta automática Nichiryo<sup>®</sup> Nichipet EX<sup>®</sup> de 10 µL a 100 µL y punta universal de 5µL a 200µL.
- ✓ La fase líquida o extracto se vertió en viales Labbox<sup>®</sup> 12 x 32 mm cónico con inserto de plástico, que fueron cerrados herméticamente utilizando tapones para viales Agilent Technologies<sup>®</sup> de tapa rosca.

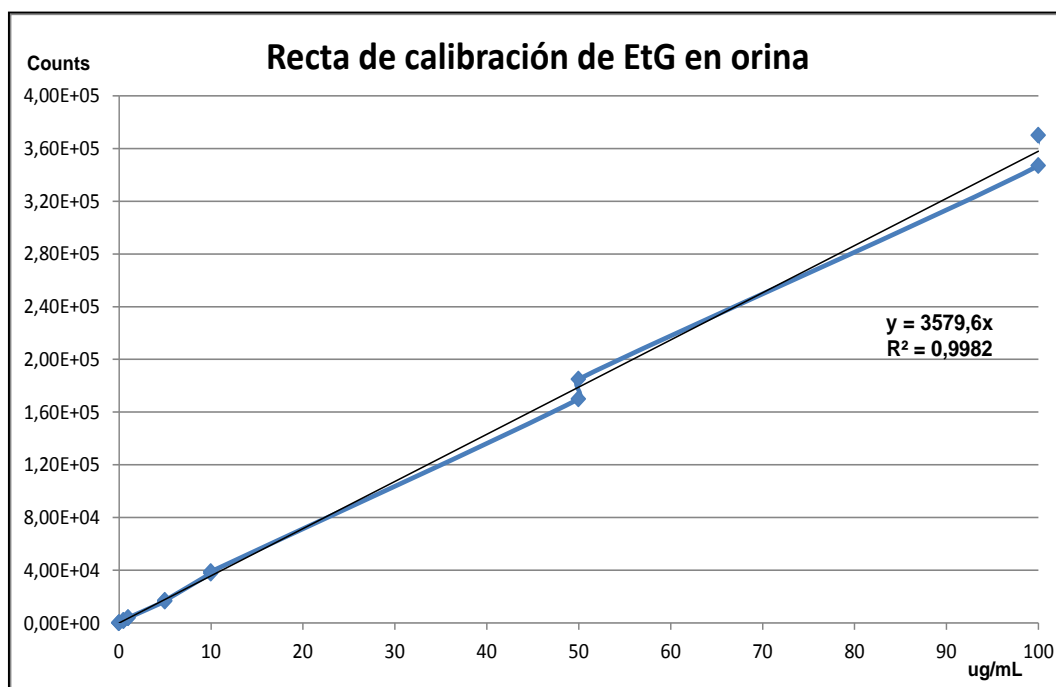
#### **F. Ensayos finales de muestras.**

Después de la preparación de las muestras de calibración, del pretratamiento de las muestras y del proceso de extracción de EtG y, con los extractos en sus respectivos viales, se procedió a los ensayos o análisis finales, como se detalla a continuación:

- ✓ Como se indicó anteriormente, el estricto orden para los ensayos finales fue: primero las muestras de orinas, después las de sangre y finalmente las de pelo.
- ✓ Primero se procedió al análisis de las muestras de calibración hasta conseguir las respectivas rectas de calibración (tabla 15 – 17) y (figura 39 – 41).

Nombre	Patrones	Altura Pico (cps)	Area Pico (counts)
Orina 0 I	Standard	0,00E+00	0,00E+00
Orina 0 II	Standard	0,00E+00	0,00E+00
Orina 0,5 I	Standard	2,79E+02	1,71E+03
Orina 0,5 II	Standard	2,75E+02	1,87E+03
Orina 1 II	Standard	5,12E+02	3,87E+03
Orina 1 I II	Standard	5,40E+02	3,91E+03
Orina 5 I	Standard	2,02E+03	1,64E+04
Orina 5 II	Standard	2,16E+03	1,70E+04
Orina 10 II	Standard	4,77E+03	3,77E+04
Orina 10 I	Standard	5,22E+03	3,90E+04
Orina 50 I	Standard	2,18E+04	1,70E+05
Orina 50 II	Standard	2,56E+04	1,85E+05
Orina 100 II	Standard	4,66E+04	3,47E+05
Orina 100 I	Standard	4,80E+04	3,70E+05

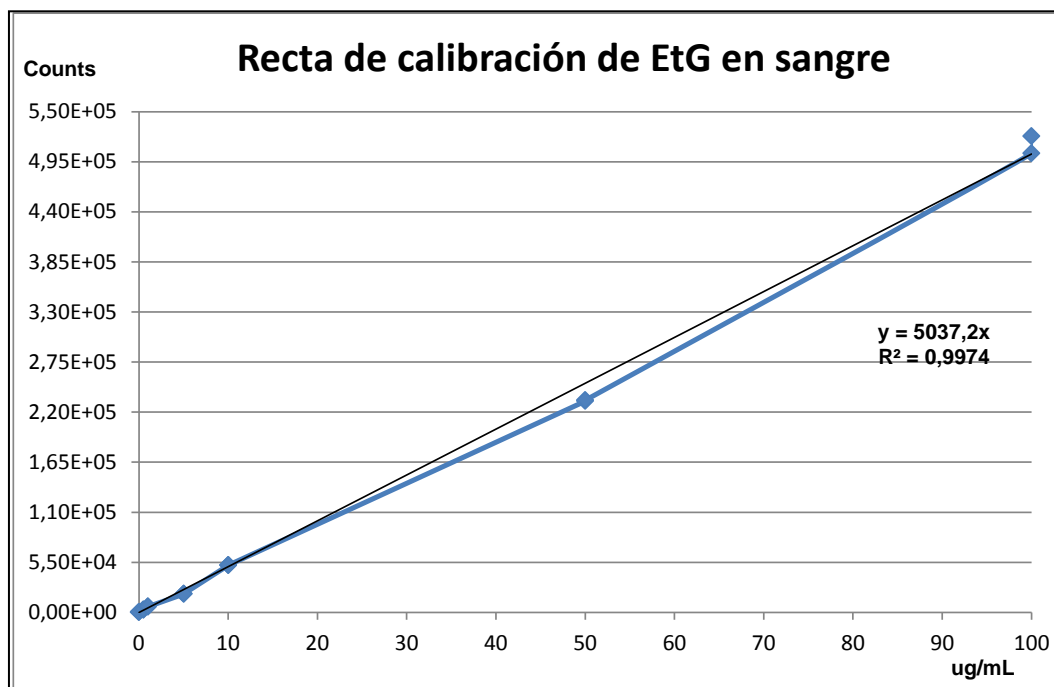
**Tabla 15:** Resultados utilizados para diseñar la recta de calibración para la cuantificación de EtG en orina. Cada muestra de calibración fue analizada por duplicado.



**Figura 39:** Recta de calibración para la cuantificación de EtG en orina, ( $R^2 = 0,9982$ ).

Nombre	Patrones	Altura Pico (cps)	Area Pico (counts)
Sangre 0 I	Standard	0,00E+00	0,00E+00
Sangre 0 II	Standard	0,00E+00	0,00E+00
Sangre 0,5 II	Standard	3,43E+02	2,48E+03
Sangre 0,5 I	Standard	5,36E+02	2,95E+03
Sangre 1 II	Standard	9,94E+02	6,02E+03
Sangre 1 I	Standard	1,01E+03	6,26E+03
Sangre 5 II	Standard	3,36E+03	2,01E+04
Sangre 5 I	Standard	2,85E+03	2,03E+04
Sangre 10 II	Standard	8,43E+03	5,17E+04
Sangre 10 I	Standard	8,83E+03	5,18E+04
Sangre 50 II	Standard	3,43E+04	2,32E+05
Sangre 50 I	Standard	3,34E+04	2,33E+05
Sangre 100 I	Standard	7,76E+04	5,04E+05
Sangre 100 II	Standard	6,59E+04	5,23E+05

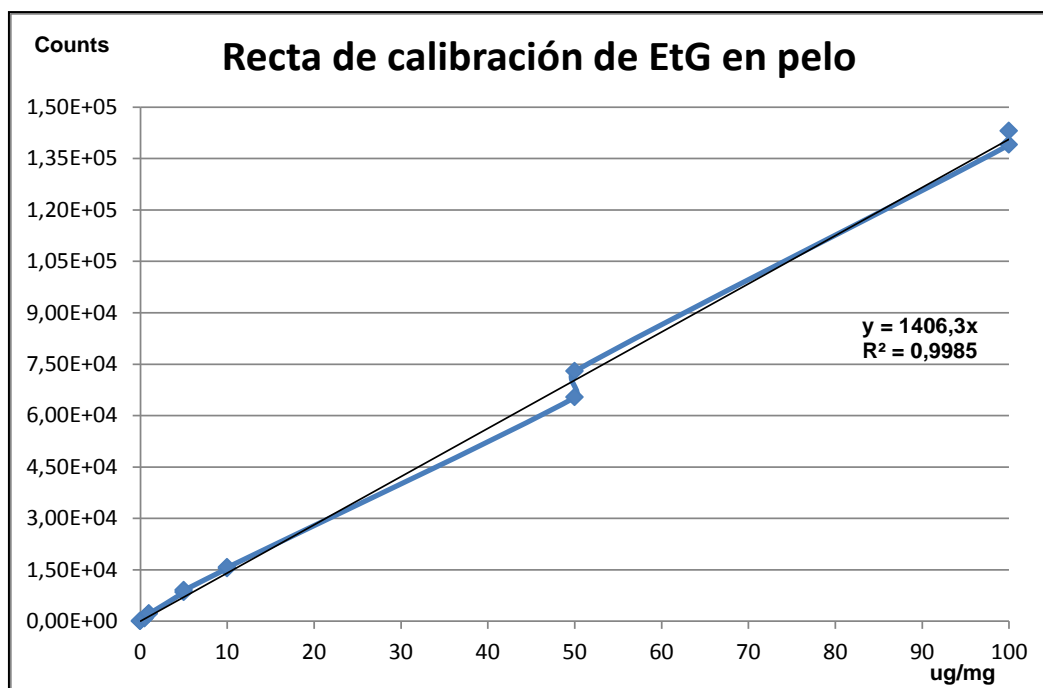
**Tabla 16:** Resultados utilizados para diseñar la recta de calibración para la cuantificación de EtG en sangre. Cada muestra de calibración fue analizada por duplicado.



**Figura 40:** Recta de calibración para la cuantificación de EtG en sangre, ( $R^2 = 0,9974$ ).

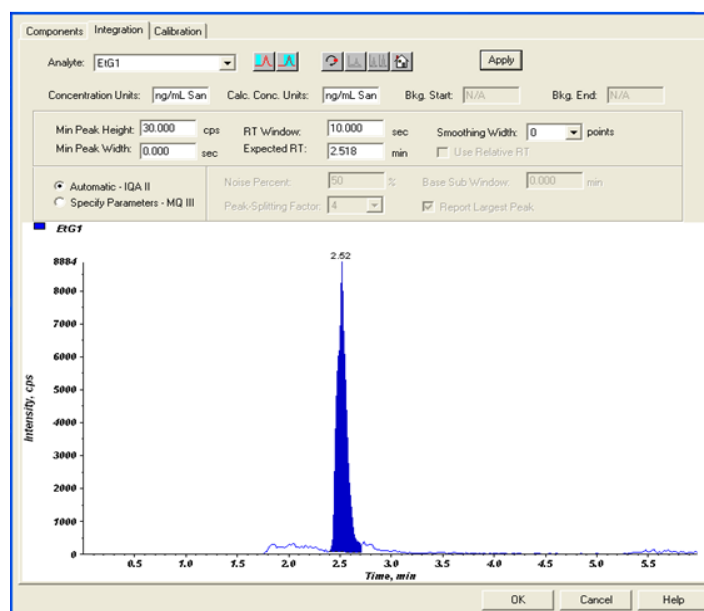
Nombre	Patrones	Altura Pico (cps)	Area Pico (counts)
Pelo 0 I	Standard	0,00E+00	0,00E+00
Pelo 0 II	Standard	0,00E+00	0,00E+00
Pelo 0,5 II	Standard	1,59E+02	7,49E+02
Pelo 0,5 I	Standard	1,89E+02	9,24E+02
Pelo 1 I	Standard	4,75E+02	2,17E+03
Pelo 1 II	Standard	3,77E+02	2,19E+03
Pelo 5 II	Standard	1,18E+03	8,44E+03
Pelo 5 I	Standard	1,34E+03	9,01E+03
Pelo 10 II	Standard	2,22E+03	1,54E+04
Pelo 10 I	Standard	2,40E+03	1,57E+04
Pelo 50 II	Standard	8,59E+03	6,53E+04
Pelo 50 I	Standard	9,79E+03	7,29E+04
Pelo 100 II	Standard	1,54E+04	1,39E+05
Pelo 100 I	Standard	1,82E+04	1,43E+05

**Tabla 17:** Resultados utilizados para diseñar la recta de calibración para la cuantificación de EtG en pelo. Cada muestra de calibración fue analizada por duplicado.



**Figura 41:** Recta de calibración para la cuantificación de EtG en pelo, ( $R^2 = 0,9985$ ).

- ✓ Posteriormente se procedió al análisis de las muestras forenses en grupos de 7 muestras, programando una secuencia estrictamente aleatoria y utilizando ácido fórmico 0,1% como disolución de lavado entre muestra y muestra.
- ✓ Antes del análisis de cada grupo de muestras, se acondicionó la columna cromatográfica inyectando 10uL de agua para LC-MS, 10 µL de acetonitrilo al 99,9%, PAI, ACS y 10µL de ácido fórmico al 0,1%.
- ✓ Para la identificación de EtG, en cada muestra analizada, se utilizaron las transiciones 220,94/84,90 y 220,94/74,90 de EtG y las transiciones 225,94/85,90 y 225,94/79,90 de EtG-D5.
- ✓ Para la cuantificación de EtG, en cada muestra analizada, se utilizó la transición 220,94/84,90 de EtG y se programó el instrumento analítico para realizar una integración automática de las áreas bajo la curva de cada pico cromatográfico identificados para EtG, según los parámetros que se muestran en la figura 35



**Figura 42:** Parámetros para la integración del área bajo la curva del pico cromatográfico (RT=2,52) que representa la transición 84,90 del etilglucurónido.

---

## 7. DIAGNOSTICO HEPÁTICO.

Para confirmar que la muestra de hígado tenía una patología producida por el consumo de bebidas alcohólicas, se utilizó el diagnóstico histopatológico de esta muestra.

Fue importante para el estudio, diagnosticar en las muestras cualquier patología relacionada con el consumo de alcohol, patologías conocidas en la literatura científica como *alcoholic liver disease* (ALD), como por ejemplo la cirrosis hepática alcohólica<sup>(157,158)</sup>. Si el diagnóstico fue positivo, se descartó cualquier otra enfermedad del hígado graso no alcohólico o *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD)<sup>(159)</sup>.

Las 41 muestras de hígado fueron preparadas según técnicas histológicas<sup>(160)</sup> para la fijación, inclusión y microtomía. La tinción posterior se realizó mediante 2 técnicas de coloración: hematoxilina-eosina y PAS-hematoxilina<sup>(161)</sup>.

Finalmente, con las muestras preparadas y montadas, el médico patólogo realizó el diagnóstico, 5 muestras en el laboratorio de anatomía patológica del IAF – Madrid y 36 muestras en el laboratorio de anatomía patológica en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

---

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos, durante la recogida de muestras, de los cadáveres se agruparon en hojas de cálculo Excel® de Microsoft Office® 2010, para identificar variables, valores y rangos, según la información específica de cada caso judicial.

### 8.1. Variables de la muestra.

Las variables cualitativas de este estudio experimental fueron seleccionadas a partir de los datos recopilados de los 73 casos forenses ( $n=73$ ). Las variables cualitativas fueron:

- a. Sexo del individuo autopsiado (Sexo).
- b. Edad del individuo autopsiado (Edad).
- c. Tipo de etiología de la muerte del caso judicial (Etiología).
- d. Tiempo de recogida de la muestra forense (Recogida).
- e. Dependencia de sustancia psicoactiva del individuo autopsiado (Dependencia).
- f. Diagnóstico hepático (Diagnóstico).

Las variables cuantitativas fueron todos los resultados de los análisis realizados a las muestras forenses recogidas de los 73 casos judiciales ( $n = 73$ ). Estas fueron las siguientes:

- a. Concentración de etanol en sangre (EtOH sangre).
- b. Concentración de acetaldehído en sangre (AcCHO sangre).
- c. Concentración de etilglucuronido en orina (EtG orina).
- d. Concentración de etilglucuronido en sangre (EtG orina).
- e. Concentración de etilglucuronido en pelo (EtG pelo).

Cada variable cuantitativa fue evaluada por duplicado y con los valores obtenidos se calculó la media. Para evaluar los valores obtenidos se calculó la desviación estándar y la varianza como medida de dispersión y el coeficiente de variación como medida de la variabilidad.



---

## 8.2. Técnicas para el análisis estadísticos.

Identificadas las variables cualitativas y los valores de las variables cuantitativas, se procedió a realizar el análisis estadístico con el programa estadístico IBM® SPSS 22, evaluando las variables con las siguientes técnicas <sup>(162,163,164,165)</sup>.

a. Coeficientes de correlación de Pearson (r).

Es una técnica paramétrica que indica si hay una relación lineal entre dos variables. El valor del coeficiente pertenece al siguiente rango [-1 y 1]. Cuando el coeficiente es cero, indica que hay una falta de correlación entre las variables. Este estudio experimental se utilizó para conocer la relación lineal entre dos variables cuantitativas. (análisis bivalente).

En este estudio experimental se utilizó para correlacionar EtOH sangre, AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo.

b. Coeficientes de correlación de Spearman (rs).

Es una técnica no paramétrica similar a Pearson, donde se utilizan rangos para hacer la relación entre variables. Su utilidad es conocer si los valores de los rangos son independientes o para conocer si las variables están directamente relacionadas. Aquí se utilizó para confirmar el análisis de Pearson cuando las variables relacionadas no tenían una distribución normal. (análisis bivalente).

En este estudio experimental se utilizó para correlacionar EtOH sangre, AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo.

c. Prueba Post-hoc.

Es una prueba estadística que analiza las varianzas de dos o más grupos de estudio. Esta prueba se desarrolla utilizando dos test estadísticos, primero el test ANOVA F para contrastar la igualdad de las medias y después el test de Duncan para contrastar pares de medias, estableciendo conjuntos de grupos e intervalos de medias no significativamente diferentes.

En este estudio experimental se utilizó correlacionar EtOH sangre, AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo.

---

d. Test ANOVA F o distribución F.

Es una técnica que analiza las varianzas de variables cuantitativas, buscando conocer el grado de dispersión entre las dos variables. También se busca una confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) y no puede tomar valores negativos. El valor 1 significa que las medias de la población son idénticas. En este estudio experimental la ANOVA F se realizó como paso previo para evaluar el test de Duncan.

En este estudio experimental se utilizó como test estadístico para evaluar la Prueba Post-hoc.

e. Test de Duncan (qr).

En este análisis estadístico se busca la verdadera diferencia significativa entre las variables relacionadas, comparando las medias de sus varianzas. En este test el valor  $\alpha$  es el nivel de significación total. Es utilizada cuando las muestras no tienen el mismo tamaño.

Es un test de comparación múltiple que perfila una hipótesis alternativa y se realiza después de ANOVA F. Las medias de las variables analizadas se orden de menor a mayor y después se comparan para conocer si quedan dentro de los rangos establecidos, según la variable objetivo o dependiente. El número de medias comparadas es el parámetro p.

En este estudio experimental se utilizó como test estadístico para evaluar la Prueba Post-hoc.

Como un análisis especial, fueron evaluadas las variables cualitativas: Sexo, Edad, Etiología, Recogida, Dependencia y Diagnóstico, para encontrar relación significativa con las variables cuantitativas: EtOH sangre, AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo.

f. Prueba de Kruskal-Wallis.

Es una técnica no paramétrica de análisis unilateral de la varianza por jerarquías. Se utiliza cuando las variables no siguen una distribución normal. El nivel de significación se medirá con el chi cuadrado ( $X^2$ ) cuando hay más de 5 observaciones con un grado de libertad (gl). Es un estadístico que se utilizó después de la prueba Post-hoc.

En este estudio experimental se utilizó este test para contrastar una variable cuantitativa (EtOH sangre), en más de 2 grupos (AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo).

---

g. Chi cuadrado ( $X^2$ ).-

Compara frecuencias observadas en cada categoría con las frecuencias esperadas. Es comparable con el test ANOVA T, pero para distribuciones no paramétricas. Es pequeña si las frecuencias son cercanas y será grande si las frecuencias son lejanas.

En este estudio experimental se utilizó como test estadístico para evaluar la prueba de Kruskal-Wallis.

h. Técnica de regresión multiple.

Es una técnica multivariante donde se relaciona una variable respuesta o dependiente y un conjunto de variables independientes.

Permite expresar la relación entre la variable dependiente y las independientes en forma de ecuación, de tal forma que sustituyendo alguna variable se puede predecir una o más combinaciones de valores no presentes en la muestra de estudio.

En este estudio experimental se utilizó como técnica para relacionar la variable dependiente EtOH y las independientes: EtG orina, EtG orina y EtG pelo.

i. La técnica del árbol de decisión <sup>(166)</sup>.

Es una técnica de segmentación recomendada cuando se buscan relaciones entre una variable dependiente y muchas variables independientes.

Es un procedimiento no paramétrico alternativo al análisis de regresión lineal. Mientras que en una técnica de regresión la relación se expresa con una ecuación, en esta técnica la relación se expresa con un árbol.

Cada árbol tiene nodos que nacen de ramas y que a medida que crecen las ramas, aumenta la profundidad del árbol.

En este diseño experimental se utilizó para predecir sucesos que pueden surgir a partir de una decisión asumida para la variable objetivo de estudio, EtOH y las variables independientes: EtG orina, EtG orina, EtG pelo, Sexo, Edad, Etiología, Recogida, Dependencia y Diagnóstico.

---

## **R**ESULTADOS Y **D**ISCUSIÓN

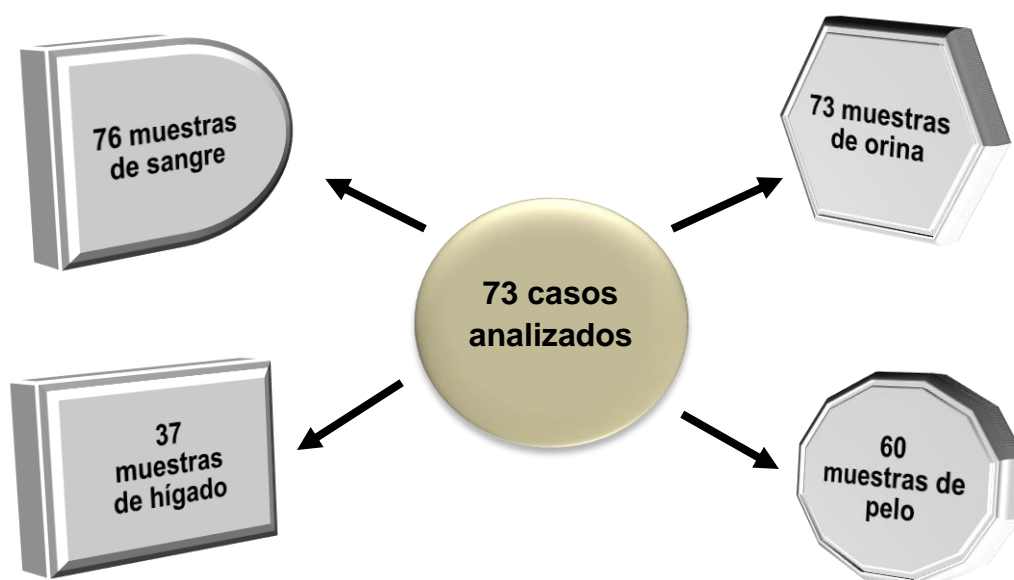
1. MUESTRA: CASOS ANALIZADOS
2. DETERMINACIÓN DE LA ALCOHOLEMIA
3. DETERMINACIÓN DE ETILGLUCURONIDO
4. DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO
5. ANALISIS ESTADÍSTICO

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. MUESTRA: CASOS ANALIZADOS

La muestra ( $n = 73$ ) de este diseño experimental está constituida por todos los casos judiciales que fueron analizados a partir de sus respectivas muestras forenses. Las diferentes circunstancias de cada autopsia judicial influyeron en el número de muestras forenses, y como se describe en la figura 35, el número de muestras fue irregular.



**Figura 35:** Gráfico que detalla la relación entre el total de casos analizados y el total de cada tipo de muestras forenses.

Los 73 casos judiciales fueron ordenados, asignando un número correlativo para cada caso. Con esta numeración se mejoró el control de los datos que se muestran en la tabla 18 y los resultados de los ensayos que se detallan más adelante. Además, con esta numeración se mantuvo el anonimato de cada caso judicial.

Caso	Recogida de Muestras (horas)	Sexo	Edad	Etiología Muerte	Dependencia Alcohol	Dependencia Drogas	Dependencia Medicamentos	Caso	Recogida de Muestras (horas)	Sexo	Edad	Etiología Muerte	Dependencia Alcohol	Dependencia Drogas	Dependencia Medicamentos
1	36	M	90	Indeterminada	No	No	No	38	19	H	34	Accidental	Si	Si	Si
2	34	H	43	Accidental	No	Si	Si	39	21,5	H	----	Natural	No	No	No
3	10,5	H	81	Suicidio	No	No	Si	40	75	H	34	Suicidio	No	No	Si
4	57	H	63	Natural	No	No	Si	41	12	H	59	Natural	No	No	No
5	50	H	42	Natural	No	No	No	42	34	H	50	Natural	Si	Si	No
6	37	H	67	Natural	No	No	No	43	14	H	37	Suicidio	No	No	Si
7	5	H	19	Suicidio	No	No	No	44	11,5	H	52	Suicidio	No	No	No
8	24,5	H	50	Suicidio	No	No	No	45	33	H	72	Natural	No	No	Si
9	30,5	H	32	Suicidio	No	No	No	46	13	H	69	Accidental	Si	No	Si
10	27	H	57	Natural	No	No	No	47	48	H	47	Natural	Si	No	No
11	20	H	45	Natural	No	Si	No	48	26	M	72	Suicidio	No	No	Si
12	30,5	M	37	Natural	Si	No	No	49	16,5	H	48	Natural	No	Si	No
13	30	H	47	Natural	No	No	No	50	8,5	H	40	Accidental	No	No	No
14	33	H	42	Accidental	Si	No	No	51	21	H	54	Natural	Si	No	No
15	17,5	H	42	Accidental	No	No	No	52	15	H	49	Natural	No	No	No
16	19	H	56	Natural	Si	No	No	53	19,5	H	74	Natural	No	No	Si
17	46	M	48	Natural	Si	No	No	54	19	H	63	Natural	No	No	No
18	14,5	H	52	Suicidio	No	No	No	55	12	H	52	Homicidio	No	Si	No
19	9,5	H	33	Accidental	No	No	Si	56	13	M	52	Indeterminada	No	Si	No
20	33	H	33	Natural	No	No	No	57	29	M	38	Suicidio	Si	No	Si
21	32	M	41	Accidental	No	Si	No	58	24	H	53	Indeterminada	No	No	Si
22	76,5	H	43	Natural	No	No	No	59	11	H	73	Natural	No	No	Si
23	22	M	60	Natural	No	No	No	60	50	H	50	Natural	Si	No	Si
24	13	M	45	Accidental	No	Si	Si	61	25,5	H	54	Accidental	No	No	No
25	8	H	53	Natural	Si	No	Si	62	14	M	64	Natural	No	No	Si
26	11,5	H	78	Suicidio	No	No	No	63	65	H	72	Natural	Si	No	Si
27	30	H	61	Natural	Si	No	No	64	144	M	41	Suicidio	No	No	Si
28	23,5	H	49	Natural	No	No	Si	65	6,5	M	18	Accidental	No	No	No
29	10	H	51	Natural	No	Si	Si	66	26	H	61	Natural	No	No	No
30	10	H	44	Natural	No	No	No	67	17,5	H	57	Natural	No	No	No
31	6,5	H	70	Natural	Si	No	Si	68	6	H	45	Suicidio	No	No	Si
32	20	H	49	Accidental	No	Si	Si	69	10	H	44	Accidental	No	Si	Si
33	20	H	37	Suicidio	No	Si	Si	70	17	H	64	Suicidio	No	No	Si
34	33	M	48	Natural	Si	Si	Si	71	21	H	----	Natural	No	No	No
35	23,5	H	50	Suicidio	Si	No	No	72	7	H	61	Natural	No	No	No
36	35,5	H	36	Accidental	Si	No	Si	73	56	H	54	Natural	Si	No	Si
37	32	M	39	Natural	No	No	Si								

**Tabla 18:** Datos de los 73 casos analizados y con sus respectivos datos relacionados según su autopsia judicial, resaltando los 2 casos donde se desconocía la edad del cadáver.

---

Con los resultados mostrados en la tabla anterior, se procede a realizar su discusión para obtener valoraciones de importancia forense, con relación al consumo de alcohol.

Los tiempos de la recogida de las muestras forenses, se calcularon por la diferencia entre la data de la muerte (indicada por el médico forense) y las 11 de la mañana del día que se realizó la autopsia judicial. Después de analizar estos tiempos, se identifica una proporción elevada, superior al 80%, para casos cuyas muestras fueron recogidas antes de las 36 horas (día y medio) de la muerte. En tan solo 8 casos, el tiempo de recogida de muerte superó los 2 días posteriores a la muerte del sujeto.

La proporción elevada, comentada anteriormente, permite deducir que en un gran número de muestras analizadas, la redistribución post mortem producida con muchas sustancias después de la muerte, como el etanol y el EtG, estará reducida <sup>(43,44,128,137)</sup>.

Analizando los datos según el sexo de los cadáveres, encontramos una predominancia de los hombres, también superior al 80%. Este dato es relacionable con la información publicada que indica que son los hombres los que tienen mayores problemas con el consumo de alcohol <sup>(1,2,167)</sup>.

Cuando analizamos las edades de los cadáveres, identificamos un amplio rango, entre 18 y 90 años, lo que permite deducir que ningún caso se corresponde con un menor de edad y que por lo tanto, según la muestra del estudio experimental, no hay relación entre el consumo de alcohol y la causa de muerte, en menores de 18 años.

Al analizar las edades, también es importante resaltar el alto porcentaje (cerca al 67%) de sujetos cuya edad estaba entre los 31 y los 60 años. Este dato es importante, porque relaciona un rango de edad probable con el consumo de alcohol y los problemas producidos por la ingesta de bebidas alcohólicas.

Según el análisis de la etiología médico legal de los casos analizados, 41 casos, más del 50 % de las muertes, fueron valorados como naturales y aunque no se muestran en la tabla 17, las causas fundamentales más predominantes correspondieron a problemas cardiorespiratorios. Este último dato permite comprender que el valor porcentual indicado, se

---

puede relacionar con el consumo abusivo de alcohol y con las patologías que este tipo de consumo produce al sistema cardiovascular y al sistema nervioso <sup>(62, 63)</sup>.

Los 17 casos por muerte accidental, muestran una proporción cercana al 20 %, estos casos agruparon los accidentes de tráfico y los accidentes laborales, por lo que sin la determinación de la alcoholemia no se puede realizar una valoración del consumo de alcohol y su relación con el accidente.

Los casos de muertes suicidas, también cercanas al 20%, deberán ser valoradas con la determinación de la alcoholemia y el consumo de otros psicoactivos. La dependencia de psicoactivos como el etanol, también es de importancia para este estudio experimental. De hecho, 32 casos (43,84%) se relacionaron con la dependencia de medicamentos, 14 casos (19,17%) con la dependencia de drogas de abuso, en 8 casos (10,96%) la información de la dependencia era desconocida y 19 casos (26,03%) se relacionaron con la dependencia de alcohol.

Los 3 casos clasificados como indeterminados, no aportan mucha información a este estudio, porque no se tuvo la autorización para acceder al informe forense final.

Es importante resaltar que los datos comentados, provienen de la información forense de cada caso judicial, por lo que será necesaria la determinación de la alcoholemia y conocer los resultados de otras sustancias psicoactivos para realizar una valoración de estos casos y relacionarlos con el consumo de alcohol. En muchos de los casos analizados, no se tuvo la autorización para acceder a los resultados analíticos de otros psicoactivos por lo que la valoración comentada, solo se podrá realizar con los datos recogidos de los archivos del IAF-Madrid.



## 2. DETERMINACIÓN DE LA ALCOHOLEMIA

Después de analizar los resultados del análisis de las 76 muestras de sangre, utilizando el HS-GC-FID, presentamos los siguientes resultados y las respectivas discusiones para obtener valoraciones de importancia forense, con relación al consumo de alcohol.

### 2.1 Determinación de etanol en muestras de sangre.

En la siguiente tabla, se puede observar los casos que dieron positivo a la prueba de etanol en sangre, mostrando las medias para los 2 análisis realizados.

Caso	Muestra	Etanol (g/L)			Caso	Muestra	Etanol (g/L)		
		EtOH 1	EtOH 2	Media			EtOH 1	EtOH 2	Media
5	5	0,6778	0,6257	0,6518	36	36	2,1821	1,9860	2,0841
6	6	1,9114	1,7535	1,8325	44	44	3,9374	3,6626	3,8000
13	13 C	1,1572	1,2475	1,2024	46	46 E	0,0848	0,0891	0,0870
13	13 E	1,0589	1,1193	1,0891	46	46 C	0,0763	0,0869	0,0816
14	14	1,9644	1,8322	1,8983	47	47	----	----	----
16	16	2,8508	2,4001	2,6255	50	50	2,0127	2,0890	2,0509
17	17	2,3122	2,3853	2,3488	55	55	0,1348	0,1373	0,1361
23	23	4,3270	4,4521	4,3896	60	60	0,7549	0,9796	0,8673
25	25	1,4834	1,6162	1,5498	65	65	0,8072	0,9731	0,8902
26	26	0,9119	0,8800	0,8960	66	66	0,0612	0,0706	0,0659
27	27	2,7281	2,7998	2,7640	67	67	1,3734	1,4955	1,4345
29	29	0,0986	0,0940	0,0963	68	68	0,4294	0,3835	0,4065
30	30	0,2981	0,2925	0,2953	71	71	0,5049	0,5653	0,5351
35	35	----	----	----	73	73	2,4184	2,4095	2,4140

**Tabla 19:** Casos con resultados positivos para etanol en sangre y los 2 casos donde no se pudo recoger muestras de sangre.

---

Como se muestra en la tabla de la figura 47 la mínima cantidad cuantificada de etanol en muestras de sangre fue 0,0659 g/L correspondiente al caso 66 y la máxima alcoholemia cuantificada fue 4,3896 g/L y correspondió al caso 23.

Después de analizar los resultados mostrados en la tabla 19 y eliminando los 2 casos donde no se pudo recoger muestra de sangre, se confirma que 26 muestras de sangre, correspondientes a 24 casos, dieron positivo a etanol y que por lo tanto, en 50 muestras, correspondientes a 47 casos, no se pudo identificar la presencia de etanol.

Con los resultados anteriores, se puede valorar que 24 casos corresponden a individuos que consumieron alcohol durante las 24 horas previas a su muerte, es decir un consumo reciente de bebidas alcohólicas.

También podemos confirmar que en 19 casos, la prueba de la alcoholemia superó el valor máximo permitido por la legislación española <sup>(66)</sup>.

El caso 66, con la menor concentración de etanol en sangre, corresponde a una muerte natural cuya causa de muerte fue descrita como un infarto agudo de miocardio. El análisis del resultado analítico y de las circunstancias de la muerte, solo permite valorar que antes de la muerte del individuo se produjo una ingesta de alcohol, pero no se puede valorar si el consumo fue agudo o crónico.

Después de analizar los resultados de los dos casos especiales analizados (caso 13 y caso 46), donde se recogió muestras de sangre de diferentes zonas (C = cardíaca y E = encefálica), se pueden valorar tres ideas importantes:

- a. Según la relación entre las medias (1,2024 y 1,0891 para el caso 13; 0,0870 y 0,0816 para el caso 46) y las desviaciones (0,0639 y 0,0427 para el caso 13; 0,0030 y 0,0075 para el caso 46), se puede valorar que la distribución del etanol en el organismo de cada individuo era casi uniforme en el momento de la muerte.
- b. Según las diferencias entre los resultados, mientras que para el caso 13 la sangre recogida de la cavidad cardíaca tiene mayor alcoholemia que la de la cavidad encefálica, en el caso 46 la diferencia es contraria: la cardíaca tiene menor alcoholemia que la encefálica. Para valorar estas diferencias es necesario estudiar las características

---

de la muerte: mientras que el caso 13 corresponde a una muerte natural por un infarto agudo de miocardio, el caso 46 corresponde a un accidente donde la muerte se debió a un traumatismo craneoencefálico por una caída casual. Estos datos finales confirman que el etanol no metabolizado se distribuye con eficiencia por el encéfalo produciendo sus efectos psicoactivos <sup>(37, 39, 168)</sup>, además se puede valorar que en el caso 46 los efectos psicoactivos del etanol pudieron ser causantes del accidente.

- c. El caso 46, con un tiempo de recogida de muestra igual a 13 horas, permite inferir que tras un traumatismo, el etanol se puede perder por ser una sustancia volátil <sup>(11,12,16)</sup>, pero esta pérdida no influye en el resultado analítico, cuando la muestra se recoge a tiempo.

El caso 23 es de valoración interesante porque la alcoholemia llegó a una media igual a 4,3896g/L, superando el valor mortal que se describe en la literatura <sup>(12, 16, 169)</sup>. Para este caso la causa inmediata de la muerte fue una parada cardiopulmonar y la determinación de la etilogía, aunque natural según los datos mostrados, estaba pendiente de análisis para su confirmación; si esos resultados analíticos fueran negativos a cualquier otro psicoactivo, la causa fundamental de la muerte sería la intoxicación por etanol, producto de un consumo excesivo o abusivo de bebidas alcohólicas. En este tipo de casos, será necesario el análisis de un metabolito secundario del etanol, como el EtG, para valorar si el consumo fue agudo o crónico.

Otro caso de interés toxicológico fue el 44. Aquí la alcoholemia tuvo una media de 3,8000 g/L, cantidad muy cercana al valor mortal de la intoxicación por etanol <sup>(12,16,166)</sup>. Para este caso la muerte fue suicida y la causa fundamental un politraumatismo. Esto permite concluir, que el sujeto aunque con un sistema muy ralentizado por los efectos del alcohol, tenía una movilidad mínima como para ejecutar el suicidio. En esta ocasión el análisis de EtG es muy importante para valorar si el consumo abusivo pudo ser agudo o crónico.

En los demás casos, los niveles de alcohol en sangre permiten valorar un consumo de alcohol, pero para confirmar si el consumo fue agudo o crónico es necesaria la determinación de EtG, por ser un metabolito que se puede cuantificar en sangre, orina y pelo <sup>(150,153,154)</sup>.

## 2.2 Determinación de acetaldehído en muestras de sangre.

Después de analizar los resultados mostrados en la tabla 20 y eliminando los 2 casos donde no se pudo recoger muestra de sangre, se confirma que 40 muestras de sangre son positivas para aldehído, correspondientes a 39 casos, y que en 36 muestras, correspondientes a 32 casos, no se pudo identificar la presencia de aldehído.

Caso	Muestra	Acetaldehído (g/L)			Caso	Muestra	Acetaldehído (g/L)		
		AcCHO 1	AcCHO 2	Media			AcCHO 1	AcCHO 2	Media
2	2	0,0073	0,0002	0,0038	30	30	0,0006	0,0012	0,0009
4	4	0,0279	0,0292	0,0286	32	32	0,0024	0,0000	0,0012
5	5	0,0029	0,0041	0,0035	35	35	----	----	----
6	6	0,0203	0,0155	0,0179	36	36	0,0235	0,0312	0,0274
10	10	0,0001	0,0001	0,0001	44	44	0,0016	0,0014	0,0015
11	11	0,0003	0,0000	0,0002	46	46 C	0,0278	0,0000	0,0139
13	13 C	0,0585	0,0386	0,0486	47	47	----	----	----
13	13 E	0,0285	0,0018	0,0152	48	48	0,0343	0,0275	0,0309
14	14	0,0048	0,0205	0,0127	50	50	0,0300	0,0267	0,0284
15	15 C	0,0003	0,0004	0,0004	51	51	0,0121	0,0105	0,0113
16	16	0,0011	0,0019	0,0015	55	55	0,0143	0,0151	0,0147
17	17	0,0296	0,0018	0,0157	60	60	0,0004	0,0003	0,0004
19	19	0,0041	0,0063	0,0052	63	63	0,0010	0,0060	0,0035
20	20	0,0005	0,0009	0,0007	65	65	0,0006	0,0008	0,0007
21	21	0,0102	0,0140	0,0121	66	66	0,0001	0,0001	0,0001
23	23	0,0310	0,0288	0,0299	67	67	0,0186	0,0264	0,0225
24	24	0,0005	0,0034	0,0020	68	68	0,0108	0,0125	0,0117
25	25	0,0014	0,0021	0,0018	69	69	0,0028	0,0000	0,0014
26	26	0,0019	0,0132	0,0076	70	70	0,0010	0,0047	0,0029
27	27	0,0019	0,0172	0,0096	71	71	0,0049	0,0018	0,0034
29	29	0,0021	0,0116	0,0069	73	73	0,0211	0,0330	0,0271

**Tabla 20:** Casos con resultados positivos para acetaldehído en sangre y los 2 casos donde no se pudo recoger muestras de sangre.

---

Estos resultados muestran que los niveles de acetaldehído en sangre son mucho más bajos comparados con los resultados de etanol. Esto es valorable desde una perspectiva metabólica, ya que se debe recordar que el acetaldehído es el principal metabolito del etanol y que su eliminación es principalmente por vía urinaria<sup>(70,72,94,96)</sup>, por lo que no es extraño que las concentraciones de este volátil, producido de forma endógena, tengan valores muy bajos.

La mínima cantidad cuantificada de acetaldehído en sangre fue 0,0001g/L para el caso 10 y el 66, y la máxima concentración detectada fue 0,0486 g/L correspondiente al caso 13, en la muestra proveniente de la zona cardiaca.

Los 39 casos con presencia de acetaldehído, principal metabolito de la biotransformación del etanol, se corresponden con individuos que consumieron alcohol previo a su muerte. El tiempo previo a la muerte no se puede valorar con certeza porque será necesario conocer la dosis de etanol consumida y la tasa metabólica del sujeto. Conociendo los datos mencionados será factible relacionar la cantidad de acetaldehído encontrado en la sangre con el consumo agudo de alcohol del sujeto; además también será factible relacionar la cantidad de acetaldehído encontrado en la sangre con el consumo agudo de alcohol.

Es importante resaltar el caso 66, porque su alcoholemia (0,0659 g/L) fue la menor que se detectó y, nuevamente, el caso es identificado como el de menor concentración del analito analizado (0,0001 g/L de acetaldehído en sangre). Si a estos resultados, sumamos los datos de este caso: individuo mayor de 60 años, cuya muestra se recogió antes de las 36 horas, sin dependencias declaradas y cuya muerte fue natural, podemos valorar que se corresponde a un consumo de alcohol esporádico o social previo a la muerte.

Los casos 13, 15 y 46 son especiales de analizar evaluando los resultados de acetaldehído en sangre. Estos casos son tres de los 5 casos donde se recogió muestra de sangre de 2 zonas diferentes (C y E). No olvidemos que el caso 13 y el caso 46 fueron evaluados de forma individual, al analizar los resultados de etanol en sangre.

Recordando las circunstancias de la muerte del caso 13, volvemos a resaltar que la muerte se correspondió con un infarto agudo al miocardio con una etiología natural y que la media de alcoholemia, de sus muestras, es superior a 1g/L de etanol. Para este caso la media de acetaldehído en la muestra 13C fue 0,0486 y 0,0152 para la muestra 13E. Estos resultados

---

relacionados con la alcoholemia descrita permiten valorar que el sujeto previo a su muerte tuvo una ingesta de alcohol y que los 2 marcadores analíticos, etanol y acetaldehído, están presentes en la misma muestra por tener una relación metabólica <sup>(70, 72,94)</sup>.

En los casos 15 y 46 se identifica una misma característica: solo las muestras provenientes de la zona cardiaca fueron positivas para aldehído en sangre y la muestra (E) resultó ser negativa. Para eliminar cualquier duda referente al análisis de estas muestras será importante analizar las circunstancias de la muerte en cada caso y relacionarlos con los resultados analíticos.

Al analizar el caso 15, identificamos que se corresponde con una muerte violenta por un accidente donde se produjo un politraumatismo; correspondencia similar que se relaciona con el caso 46, como se describió anteriormente: muerte violenta producida por un accidente y que generó un traumatismo craneoencefálico.

Para el caso 15, podemos agregar que su edad está entre los 31 y 60 años, y se indicaba que no tenía ninguna dependencia. En cambio, el caso 46 corresponde a un sujeto mayor a los 60 años y se indicó que tenía dependencia al alcohol y a los medicamentos.

La diferencia analítica entre estos casos es que, en el caso 15 la determinación de la alcoholemia fue negativa y para el caso 46 la media, entre sus muestras, fue superior a 0,0800g/L de etanol en sangre. La similitud analítica es que la media de acetaldehído en la muestra 15 C fue de 0,0004 g/L y la media en la muestra 46 C fue de 0,0139 g/L de acetaldehído en sangre.

En los dos casos la muestra de la zona encefálica fue negativa, esto se puede justificar por las circunstancias de la muerte, descritas en párrafos anteriores, y porque el acetaldehído se produce en el organismo para ser eliminado, principalmente por la orina <sup>(39,72)</sup>.

Conocidas las circunstancias de la muerte y los resultados analíticos se puede valorar que la existencia de acetaldehído en sangre confirma la presencia de etanol en la misma muestra y el consumo de alcohol previo a la muerte; además que el acetaldehído puede ser detectado tiempo después de la eliminación del organismo. En este tipo de casos será importante valorar si el etanol fue eliminado o biotrasformado en otro metabolito diferente al

---

acetaldehído, como puede ser el EtG y relacionarlo con un consumo agudo o crónico de etanol.

En los demás casos, los niveles de acetaldehído en sangre permiten inferir que previo a la muerte existió la ingesta de bebidas alcohólicas, pero es necesario conocer los resultados de la determinación de EtG, para ampliar las valoraciones.

### **2.3 Determinación de otros volátiles en muestras de sangre.**

En dos muestras de sangre, correspondientes al caso 1 y al caso 60, se detectaron trazas de metanol, que no se acercan a los valores denominados letales <sup>(12)</sup>.

Los resultados comentados pueden relacionarse con el consumo crónico de alcohol, ya que el metanol es un congénere del etanol <sup>(98,99,100)</sup>. La información que tenemos hasta el momento es que el caso 1 fue negativo para etanol y acetaldehído en sangre, y en cambio, el caso 60 fue positivo para etanol y acetaldehído. Para que la valoración tenga más firmeza, será importante que esté acompañada del análisis de las circunstancias de la muerte y de los resultados del análisis de EtG en pelo.

Los casos 17, 46 y 63 fueron positivos para isopropanol. La utilidad de este volátil es reducida para la valoración del consumo de alcohol, pero su detección permite inferir el tipo de bebida alcohólica consumida previa a la muerte, ya que el isopropanol puede estar presente en diferentes variedades de vino <sup>(25,27)</sup>.

El último volátil que también fue detectado tras el análisis por HS-GC-FD fue la acetona. Los casos 3, 17, 18, 28, 46, 52, 63 y 70 fueron aquellos donde se detectó esta sustancia volátil. La acetona es uno de los cuerpos cetónicos descritos como marcadores indirectos del metabolismo de etanol <sup>(99,115,116)</sup> pero, como ya se informó, su biotransformación no se debe exclusivamente al consumo de alcohol.

En los casos anteriores, la valoración del consumo de alcohol necesita de los resultados del análisis de EtG en sangre, orina y pelo, y de los antecedentes patológicos de cada sujeto. Como no se pudo acceder a los antecedentes, la valoración no se puede realizar.

---

El caso que resalta nuevamente es el 46, cuya muestra de sangre fue positiva para etanol y acetaldehído, y ahora positiva para acetona e isopropanol.

La existencia de etanol, acetaldehído y acetona, permiten inferir que hay gran probabilidad que este sujeto fuera un bebedor abusivo de alcohol, para confirmar si el consumo era agudo o crónico es importante conocer los resultados de la determinación de EtG en sangre, orina y pelo, además del diagnóstico histopatológico.

Ya se comentó la información que permite inferir la presencia de isopropanol en la muestra de sangre.



---

### 3. DETERMINACIÓN DE ETILGLUCURONIDO

A continuación se detallan los resultados analíticos, en estricto orden de análisis y las correspondientes discusiones para lograr valoraciones de interés forense, con relación al consumo de alcohol.

#### 3.1. Determinación de EtG en muestras forenses de orina.

Diseñada la recta de calibración para la determinación de EtG en orina, se procedió al análisis de las 73 muestras de orina, cumpliendo lo descrito en el apartado 6.3 D, E y F. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 21.

Los resultados obtenidos en las muestras de orina indican que en 35 casos, aproximadamente 48% de los casos analizados, se detectó EtG, en dicha muestra. El límite de cuantificación (LOQ) fue 0,3255 µg/mL de EtG en orina, que correspondió al caso 47 y que la concentración máxima detectada fue 181,7242µg/mL para el caso 14. En los 35 casos comentados se relaciona el nivel de EtG en orina con el consumo de alcohol previo a la muerte de cada sujeto.

38 casos son negativos para EtG, lo que permite inferir, en estos casos, que no existió ingesta de alcohol durante aproximadamente 30 horas previas a la muerte <sup>(123,170)</sup>.

En 6 casos se detectaron niveles superiores o iguales a 100 µg/mL, los casos fueron el 5, 13, 14, 17, 27 y 60. Solamente con estos niveles, se puede valorar una relación con el consumo abusivo de alcohol previo a la muerte. Para hacer la valoración relacionado con el consumo crónico de alcohol, será necesario conocer los niveles de EtG en pelo y los resultados histopatológicos.

Del grupo anterior resalta el caso 13, con un nivel de EtG en orina igual a 111,5348µg/mL, porque también fue identificado como positivo para etanol en sangre, con una media entre muestras > 1g/L, y para acetaldehído en sangre, donde fue el caso donde se

detectó la mayor concentración (0,0486 g/L). Estos resultados permiten valorar la ingesta abusiva de bebidas alcohólicas previa a la muerte.

El caso 23 también se debe resaltar; este caso es negativo para EtG en orina aunque fue el caso donde se detectó la mayor alcoholemia (4,3896 g/L) y además positivo para acetaldehído en sangre (0,0299 g/L). Esta heterogeneidad se puede explicar porque el nivel de etanol en sangre es mortal <sup>(12,16,166)</sup> y es probable que el tiempo perimortem, solo permitiera el metabolismo oxidativo del etanol <sup>(70, 72,94)</sup> y fuera limitante para la producción del EtG. Esto último se debe confirmar con los resultados de EtG en sangre.

Caso	Muestra	EtG Orina (ug/mL)			Caso	Muestra	EtG Orina (ug/mL)		
		EtG Ori 1	EtG Ori 2	Media			EtG Ori 1	EtG Ori 2	Media
4	4	8,8278	8,6043	8,7161	44	44	65,650	59,364	62,5070
5	5	122,0807	130,4615	126,2711	45	45	44,6977	39,1105	41,9041
6	6	28,7742	34,9201	31,8472	46	46	13,9960	13,1020	13,5490
12	12	15,1414	16,5382	15,8398	47	47	0,3352	0,3157	0,3255
13	13	104,7603	118,3093	111,5348	49	49	50,2849	50,1453	50,2151
14	14	167,6165	195,8319	181,7242	50	50	35,4788	36,5963	36,0376
15	15	16,5102	23,4663	19,9883	55	55	11,1744	10,9509	11,0627
16	16	20,3375	25,0028	22,6702	56	56	8,1713	8,8697	8,5205
17	17	153,9557	148,3406	151,1482	60	60	163,7054	121,1029	142,4042
25	25	67,3260	62,2975	64,8118	65	65	4,4977	5,2520	4,8749
26	26	14,052	15,952	15,0017	66	66	45,2565	36,8756	41,0661
27	27	105,878	109,230	107,5540	67	67	32,4059	39,9486	36,1773
30	30	27,419	28,439	27,9291	68	68	45,5358	47,7707	46,6533
35	35	9,6938	9,1630	9,4284	69	69	13,5211	13,7725	13,6468
36	36	99,1731	93,3065	96,2398	71	71	33,5233	30,1710	31,8472
37	37	24,7234	24,1368	24,4301	72	72	1,5784	1,5868	1,5826
39	39	11,5935	12,1522	11,8729	73	73	37,1550	29,6122	33,3836
41	41	0,6411	0,6453	0,6432					

**Tabla 21:** Casos con resultados positivos para EtG en orina.

---

El caso 66 nuevamente resalta porque, mientras que la alcoholemia y la cantidad de acetaldehído en sangre fueron las mas bajas que se detectaron (0,0659 g/L para el etanol y 0,0001 g/L para el acetañdehído), el nivel de EtG en orina se estimó en 41,0661 g/L. Esta relación se puede valorar, si se confirma que la ingesta de alcohol se detuvo 30 horas antes de la muerte del individuo <sup>(123,168)</sup> y si conocemos los niveles de EtG en sangre.

El caso 15 y 46 vuelven a ser objeto de valoración. Estos casos, ya descritos por sus niveles de etanol y acetaldehído en sangre, tienen niveles de EtG en orina iguales a 19,9883µg/mL y 13,5490µg/mL, respectivamente. Con estos resultados se descarta cualquier duda por los análisis de etanol y acetaldehído en sangre, y se confirma la ingesta de alcohol previo a la muerte.

Cuando se valoró el caso 46, se analizaron las circunstancias de la muerte, los niveles de etanol y de acetaldehído en sangre; si agregamos el nivel de EtG encontrado en a orina, confirmamos que este caso se relaciona con el consumo de alcohol. Para confirmar si el consumo fue agudo o crónico, se necesita de los análisis de EtG en sangre y en pelo, respectivamente.

Aunque la evaluación individual de otros casos puede explicar una relación entre los niveles de etanol y acetaldehído en sangre y el nivel de EtG en orina, será necesario el estudio estadístico de todos los resultados analíticos para inferir una relación general y concluyente relacionada con el consumo de alcohol. Más adelante se describen los resultados del estudio estadístico.

### **3.2. Determinación de EtG en muestras forenses de sangre.**

Diseñada la recta de calibración para la determinación de EtG en sangre, se procedió al análisis de las 76 muestras de sangre, cumpliendo lo descrito en el apartado 6.3 D, E y F. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

Descartando los dos casos donde no se pudo recoger muestra de sangre, los resultados obtenidos indican que en 42 muestras de sangre no se detectó EtG, esto se corresponde a 40 casos. Se puede inferir que en estos casos no existió ingesta de alcohol durante aproximadamente 10 horas previas a la muerte <sup>(123)</sup>.

Caso	Muestra	EtG Sangre (ug/mL)			Caso	Muestra	EtG Sangre (ug/mL)		
		EtG San 1	EtG San 2	Media			EtG San 1	EtG San 2	Media
4	4	0,0910	0,0955	0,0933	36	36	1,9098	1,7530	1,8314
5	5	0,5003	0,6909	0,5956	39	39	0,3127	0,3057	0,3092
6	6	1,6021	1,6676	1,6349	44	44	4,6752	4,5859	4,6306
12	12	0,4010	0,3792	0,3901	45	45	0,0995	0,0864	0,0930
13	13 C	1,1574	1,2904	1,2239	46	46 E	0,2025	0,2422	0,2224
13	13 E	1,1931	1,0482	1,1207	46	46 C	0,3137	0,3643	0,3390
14	14	1,9852	2,1838	2,0845	47	47	----	----	----
15	15 C	0,1024	0,0951	0,0988	48	48	0,2819	0,2283	0,2551
15	15 E	0,0647	0,0635	0,0641	49	49	0,1386	0,1378	0,1382
16	16	2,2632	2,0249	2,1441	50	50	3,7918	3,3749	3,5834
17	17	1,6676	1,6716	1,6696	56	56	0,1916	0,1940	0,1928
23	23	2,6801	2,7396	2,7099	60	60	1,1653	1,0561	1,1107
25	25	1,9713	1,9455	1,9584	65	65	0,6571	0,6581	0,6576
26	26	1,6061	1,5663	1,5862	67	67	1,4591	1,5167	1,4879
27	27	1,4353	1,4125	1,4239	68	68	2,4021	2,6404	2,5213
29	29	0,129	0,119	0,1240	71	71	0,4963	0,4447	0,4705
30	30	0,4467	0,4169	0,4318	72	72	0,0647	0,0605	0,0626
35	35	----	----	----	73	73	1,4482	1,4502	1,4492

**Tabla 22:** Casos con resultados positivos para EtG en sangre y los 2 casos donde no se pudo recoger muestras de sangre

Las 34 muestras, positivas para EtG en sangre, se corresponden con 31 casos. En estos casos se puede inferir el consumo de alcohol previo a la muerte de cada sujeto.

El límite de cuantificación (LOQ) fue 0,0626µg/mL de EtG en sangre, que correspondió al caso 72 y la concentración máxima detectada fue 4,6306 µg/mL para el caso 44.

---

Los casos 13, 15 y 46, son 3 de los 5 casos especiales donde se pudo recoger sangre de la zona C y E. Analizando sus resultados se concluye que, en los 3 casos, la concentración de EtG es mayor en la zona cardiaca que en la encefálica, pero que las diferencias no son relevantes. Esto se justifica porque la biosíntesis del EtG se produce en una alta proporción en el hígado <sup>(119,121)</sup> y porque su distribución se inicia en el sistema porta que lleva la sangre hasta el corazón <sup>(68,69)</sup>, por lo que la concentración será mayor en la zona cardiaca.

El caso 46 tiene los siguientes resultados, media aproximada entre cuatro muestras igual a 0,0800g/L de etanol en sangre, una media aproximada igual a 0,0060 g/L de acetaldehído en sangre, 13,5490 µg/mL de EtG en orina y una media aproximada de 0.2800µg/mL de EtG en sangre. Con estos resultados podemos confirmar el consumo agudo de alcohol previo a la muerte del individuo. Con estos datos se puede inferir que el accidente que provocó la muerte del sujeto, está relacionado con el consumo de alcohol

Para el caso 46, serán necesarios los resultados del análisis de EtG en pelo y del diagnóstico histopatológico para confirmar el tipo de bebedor que era el individuo.

El caso 15 resalta al analizar los resultados de EtG en sangre (0.08145µg/mL). Este caso fue positivo para EtG en orina con un nivel igual a 19,9883µg/mL, también positivo para acetaldehído en sangre con una concentración media igual a 0,0002g/L, pero negativo para etanol en sangre. Estos resultados valorados en conjunto son justificables con dos ideas importantes:

- a. El EtG alcanza un valor máximo aproximadamente 1,5 horas después del valor máximo de etanol en sangre y porque los valores de EtG en sangre son mucho menores que los valores de etanol en sangre <sup>(168)</sup>. Por lo que se justifica que la muestra de sangre es positiva para EtG y negativa para etanol.
- b. El producto del metabolismo oxidativo del etanol se elimina como acetaldehído por la orina <sup>(94-96)</sup> y el EtG producido de forma endógena se puede eliminar gradualmente por la orina <sup>(119,120)</sup>. Por lo que se justifica que el caso tenga un alto nivel de EtG en orina y una concentración baja de acetaldehído en sangre.

Con el análisis anterior se puede valorar, para el caso 15, el consumo social o esporádico de alcohol previo a la muerte del individuo.

---

El análisis del caso 72 justifica la valoración anterior. Este caso fue negativo para etanol y acetaldehído en sangre, pero positivo para EtG en sangre (4,6306µg/mL) y, aunque no se mencionó anteriormente, positivo para EtG en orina (1,5826µg/mL). Se puede inferir, como en el caso anterior y por las mismas justificaciones, que existió un consumo social o esporádico previo a la muerte. Lo que no se puede valorar es la cantidad de alcohol absorbido durante la ingesta de la bebida alcohólica.

Los casos 23 y 44, positivos para la prueba de la alcoholemia, también son positivos para EtG en sangre. Esto confirma el consumo agudo de alcohol previo a la muerte de los respectivos sujetos.

Como ya se explicó al analizar los resultados de EtG en orina, su relación con los niveles de etanol y acetaldehído en sangre permiten la valoración del consumo agudo de alcohol, pero cuando añadimos los niveles de EtG en sangre la valoración se confirma.

Más adelante se discutirán los resultados estadísticos del análisis de todos los resultados comentados hasta el momento, con el objetivo de encontrar una relación general entre el etanol y el acetaldehído en sangre, y el EtG presente en orina y sangre.

### **3.3. Determinación de EtG en muestras forenses de pelo.**

Diseñada la recta de calibración para la determinación de EtG en pelo, se procedió al análisis de las 60 muestras de pelo, cumpliendo lo descrito en el apartado 6.3.D, E y F. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 23.

Descartando los 13 casos donde no se pudo recoger muestra de pelo, los resultados obtenidos indican que 26 muestras de pelo fueron positivas y que por lo tanto en 26 casos se puede valorar el consumo crónico de etanol. Conociendo únicamente estos valores, no se puede valorar la ingesta de bebida alcohólica previa a la muerte de cada sujeto.

De los 34 casos negativos para EtG en pelo se puede inferir que el consumo crónico de etanol no existió durante los últimos 3 meses previos a la muerte <sup>(51)</sup>.

Caso	Muestra	EtG Pelo (ug/mg)			Caso	Muestra	EtG Pelo (ug/mg)		
		EtG Pelo 1	EtG Pelo 2	Media			EtG Pelo 1	EtG Pelo 2	Media
6	6	7,982	8,860	8,4210	39	39	2,776	2,871	2,8233
8	8	----	----	----	44	44	0,5082	0,4256	0,4669
13	13	0,1455	0,1554	0,1505	46	46	0,4450	0,4390	0,4420
14	14	0,1923	0,1734	0,1829	47	47	1,524	1,356	1,4400
16	16	----	----	----	51	51	0,2048	0,1955	0,2002
17	17	3,008	3,203	3,1055	52	52	0,2900	0,2985	0,2943
19	19	----	----	----	53	53	0,3933	0,3898	0,3916
21	21	----	----	----	55	55	0,1977	0,2182	0,2080
24	24	0,1476	0,1375	0,1426	56	56	----	----	----
25	25	0,2073	0,2125	0,2099	58	58	----	----	----
26	26	0,2835	0,2419	0,2627	60	60	0,0652	0,0677	0,0665
27	27	5,8660	5,5632	5,7146	61	61	0,2400	0,2316	0,2358
29	29	0,1282	0,1398	0,1340	65	65	0,2337	0,2009	0,2173
30	30	0,1962	0,2032	0,1997	67	67	----	----	----
32	32	0,1611	0,1804	0,1708	68	68	----	----	----
34	34	0,2894	0,2563	0,2729	69	69	0,1780	0,1853	0,1817
35	35	----	----	----	71	71	4,5147	4,3178	4,4163
36	36	----	----	----	72	72	----	----	----
37	37	----	----	----	73	73	0,1826	0,1977	0,1902
38	38	----	----	----					

**Tabla 23:** Casos con resultados positivos para EtG en pelo y los 13 casos donde no se pudo recoger muestras de pelo.

El límite de cuantificación (LOQ) fue 0,0665 µg/mg de EtG en pelo, que se corresponde con el caso 60 y la máxima concentración detectada fue 8,4210µg/mg para el caso 6.

El caso 6, con la mayor concentración de EtG en pelo, fue positivo a todos los análisis descritos hasta el momento y aunque hasta el momento no lo hemos descrito como caso especial para su valoración, todos sus resultados permiten inferir que hay relación probada

---

con el consumo crónico de alcohol. Además se confirma que la muerte por hemoperitoneo (etiología natural) fue motivada por la abusiva de bebidas alcohólicas.

El caso 60, al igual que como el caso anterior, no fue descrito hasta el momento. Este caso también es positivo para todos los ensayos descritos hasta el momento e incluso se puede resaltar que el valor de EtG en orina alcanzó los 142,4042 µg/mL. Todos los resultados permiten valorar el consumo crónico. Al igual que en el caso anterior, la muerte producida por una hemorragia digestiva (etiología natural) se relaciona con el consumo abusivo de alcohol de este individuo.

Relacionar presencia de etanol o acetaldehído en sangre con los niveles de EtG en pelo, según la información publicada <sup>(50,133,135)</sup>, no permite una correcta valoración del tipo de consumo de alcohol producido, pero analizar los casos 13 y 46 es muy importante en este estudio experimental.

Según los resultados descritos hasta el momento, el caso 13 es positivo para etanol y acetaldehído en sangre, y además para EtG en sangre y orina. Si añadimos el resultado de EtG en pelo, se puede inferir que este caso se corresponde con un bebedor crónico de alcohol porque el nivel de EtG detectado fue igual a 0,1505 µg/mg.

Ocurre lo mismo con el caso 46, analizando la media detectada de EtG en pelo (0,4420µg/mg) y los niveles de EtG en sangre y orina, y al valor positivo para la alcoholemia, se puede inferir que el caso también se corresponde con un bebedor crónico de alcohol. Además confirmamos que el accidente que produjo la muerte en este sujeto se relaciona con el consumo abusivo de alcohol.

Cuando buscamos una relación entre los niveles de EtG en orina y los resultados que se están analizando, encontramos dos casos que resaltan y que a continuación analizamos. El caso 47, descrito por ser el de menor concentración de EtG en orina (0,3255µg/mL), fue positivo a EtG en pelo con una concentración igual a 1,4400 µg/mg y, aunque en este caso no se pudo recoger muestra de sangre, los niveles descritos permiten valorar que el caso se corresponde con el consumo crónico de etanol. Para confirmar esta inferencia, será importante el diagnóstico histopatológico.



---

El caso 14, cuya muestra de orina contenía la máxima concentración de EtG (181,7242 µg/mL), fue positiva para el análisis de EtG en pelo (0,1829 µg/mg). Si a lo descrito anteriormente, agregamos que en sangre los valores de etanol y acetaldehído fueron positivos, que la concentración media de EtG en sangre fue estimada en 2,0845 µg/mg, se puede valorar el caso como relacionado a un individuo que consumía de forma crónica bebidas alcohólicas. El análisis histopatológico del hígado podrá confirmar la inferencia descrita para este caso.

Un caso resalta cuando buscamos una relación entre los niveles de EtG en sangre y los resultados de EtG en pelo. La mayor concentración de EtG detectado en sangre le correspondió al caso 44 (4,6306 µg/mL). Este caso fue positivo para EtG en pelo con valor medio igual a 0,4669 µg/mg y también fue positivo a EtG en orina con una concentración igual a 62.5070 µg/mL. Si añadimos a este análisis que su valor de la alcoholemia era letal (3,800 g/L) y que los niveles de acetaldehído en sangre se estimó en 0,0015 g/L, la valoración de este caso es consistente con el consumo abusivo y crónico de alcohol. Los resultados del diagnóstico histopatológico del hígado permitirá confirmar la ingesta crónica de bebidas alcohólicas.

Al igual que con los niveles de EtG en orina y sangre, será muy importante el análisis estadístico de los resultados descritos hasta el momento para relacionarlos con el consumo agudo o crónico de alcohol.

#### 4. DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO

A continuación, en la tabla 24, se puede observar todos los 36 casos donde se pudo recoger las respectivas muestras de hígado y sus resultados para el diagnóstico de hepatopatología.

Caso	Muestra	Diagnóstico hepatopatológico	Diagnóstico específico	Caso	Muestra	Diagnóstico hepatopatológico	Diagnóstico específico
3	3	Hepato patía	Es teato sis	53	53	Hepato patía	Cirro sis
4	4	Hepato patía	Hepatitis	54	54	Hepato patía	Hepatitis
13	13	Hepato patía	Es teato sis	55	55	Hepato patía	Hepatitis
14	14	Hepato patía	Es teato sis	57	57	Normal	Normal
32	32	Hepato patía	Es teato sis	58	58	Hepato patía	Es teato sis
33	33	Hepato patía	Cirro sis	59	59	Hepato patía	Hepatitis
39	39	Hepato patía	Es teato sis	60	60	Hepato patía	Es teato sis
40	40	Hepato patía	Es teato sis	61	61	Hepato patía	Cirro sis
41	41	Hepato patía	Hepatitis	62	62	Hepato patía	Hepatitis
42	42	Hepato patía	Cirro sis	63	63	Hepato patía	Es teato sis
43	43	Hepato patía	Hepatitis	64	64	Hepato patía	Cirro sis
44	44	Hepato patía	Es teato sis	65	65	Hepato patía	Hepatitis
45	45	Hepato patía	Es teato sis	67	67	Hepato patía	Cirro sis
46	46	Hepato patía	Cirro sis	68	68	Hepato patía	Es teato sis
48	48	Normal	Normal	69	69	Normal	Normal
49	49	Hepato patía	Cirro sis	70	70	Hepato patía	Hepatitis
50	50	Normal	Normal	72	72	Hepato patía	Cirro sis
51	51	Normal	Normal	73	73	Hepato patía	Hepatitis
52	52	Hepato patía	Hepatitis				

**Figura 24:** Resultados del diagnóstico específico hepático, en los casos donde se pudo recoger las respectivas muestras.

---

De las 37 muestras de hígado diagnosticadas, 5 fueron normales y 32 fueron descritas como muestras con hepatopatía alcohólica.

De las 32 muestras con hepatopatía relacionada con el consumo de alcohol, 12 se relacionaron con un esteatosis, 11 con una hepatitis y 9 con una cirrosis.

El caso 14, que analizamos anteriormente, fue diagnosticado para esteatosis alcohólica, por lo que se confirma la valoración realizada en el apartado anterior. Este caso se corresponde con un sujeto que consumía alcohol de forma crónica y abusiva.

Si comparamos el caso 14 y el 47, se confirma la importancia del análisis de EtG en orina y pelo para valorar un consumo agudo o crónico de alcohol respectivamente. Aunque la sangre y el hígado estuvieron ausentes en el caso 47, la comparación de sus respectivos niveles de EtG en orina y pelo permiten inferir que la detección del metabolito en cualquier muestra forense es una herramienta útil en la valoración del consumo de alcohol comentado.

El caso 60 destaca al analizar los resultados mostrados en este apartado, ya que es el caso donde se detectó la menor concentración de EtG en pelo (0,0665 µg/mg) y tiene un diagnóstico histopatológico positivo descrito como esteatosis. Esto permite inferir que la presencia de EtG en pelo es una herramienta importante para la valoración del consumo crónico de etanol.

La mayor concentración de EtG en pelo le correspondió al caso 6 con una media estimada en 8,4210µg/mg. En este caso no se pudo recoger muestra de hígado, pero si compramos su nivel de EtG en pelo y el detectado en el caso 60, podemos inferir que el caso 6, sin diagnóstico histopatológico, corresponde a un bebedor crónico de alcohol.

Cuando analizamos los casos 72 y 44, debemos recordar que fueron el 72 fue el de menor nivel de EtG en sangre y el 44 donde se detectó la mayor concentración de EtG en sangre. Además es importante indicar que el pelo estaba ausente en el caso 72 y que para el caso 44 se estimó una concentración igual a 0.4669µg/mg de EtG en la muestra. Por último se añade a este análisis los resultados histopatológico, siendo cirrosis para el caso 72 y para el caso 44 esteatosis. Con todo lo descrito hasta el momento valoramos que los dos casos, aunque con diferentes muestras forenses, se corresponden con el consumo crónico de etanol.

---

Desde el análisis de los resultados de alcoholemia, se reitera la observación de los casos 13 y 46. Estos casos fueron positivos para el diagnóstico histopatológico, detectándose esteatosis para el caso 13 y cirrosis para el caso 46, lo que confirma las hipótesis que han explicado hasta el momento. Se puede valorar que estos 2 casos se corresponden con sujetos de ingesta abusiva y crónica de etanol.

Será importante encontrar una relación entre el tipo de histopatológico y el nivel acumulado de EtG en pelo como herramientas para la valoración del consumo crónico de alcohol. Los resultados de la evaluación estadística se describen más adelante.

Relacionar datos analíticos de etanol, acetaldehído y EtG en diferentes muestras forenses permite valorar con eficiencia el tipo de consumo de alcohol, pero para realizar una inferencia general, será necesario el análisis estadístico de todos los resultados descritos hasta el momento. Este análisis y sus resultados se describen más adelante.

Como valoración final, se muestran los casos donde la información indicaba que el individuo tenía una dependencia al alcohol.

---

## 5. ANALISIS ESTADÍSTICO

Como se explicó en el apartado 8 de material y métodos, se utilizaron diferentes pruebas estadísticas para buscar correlaciones significativas entre las diferentes variables cualitativas y cuantitativas.

La variable objetivo o dependiente fue EtOH sangre. Esta variable fue analizada por técnicas de análisis bivalente, para encontrar relaciones con las variables independientes: AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina, EtG pelo y posteriormente se evaluaron dos pruebas multivariantes de predicción con todas las variables independientes de este estudio experimental: AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina, EtG pelo, Sexo, Edad, Etiología, Recogida, Dependencia y Diagnóstico.

### 5.1. Análisis bivalente.

A continuación se detallan únicamente aquellos resultados donde se obtuvo significación estadística en la comparación de 2 grupos de variables o en más de 2 grupos de variables.

#### A. Correlación de Pearson.

La primera relación analizada comparó los grupos de los niveles de EtOH en sangre y de AcCHO en sangre según la correlación de Pearson. Los resultados obtenidos de esta comparación se describen en la tabla 25.

La correlación de Pearson muestra que los dos grupos cuantitativos no presentan una relación lineal, pero si una correlación significativa ( $p < 0,001$ ). Esto se justifica sabiendo que el acetaldehído se produce de forma endógena a partir del etanol, por un proceso metabólico. Las valores de las concentraciones pueden ser diferentes entre los grupos estudiados, pero si existe una correlación entre ellos.

Correlaciones			
		Etanol en sangre	Acetaldehído en sangre
Etanol en sangre	Correlación de Pearson	1,00	0,514**
	Sig. (bilateral)		0,000002031261
	N	76	76
** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas)			

**Figura 25** Resultados estadísticos de la correlación de Pearson para los valores de EtOH sangre y AcCHO sangre, en muestras de cadáveres.

## B. Correlación de Spearman.

Conociendo que las distribuciones de los datos entre EtOH sangre y AcCHO sangre no son normales, estas fueron evaluadas por la comparación no paramétrica de Spearman, con el objetivo de confirmar si los rangos de las variables están relacionadas. En la tabla 26 se muestran los resultados de esta nueva comparación:

Correlaciones no paramétricas			
Rho de Spearman		Etanol en sangre	Acetaldehído en sangre
Etanol en sangre	Coefficiente de correlación	1,000	0,679**
	Sig. (bilateral)		0,0000000000016
	N	76	76
** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas)			

**Tabla 26:** Resultados estadísticos de la correlación de Spearman para los rangos de EtOH sangre y AcCHO sangre, en muestras de cadáveres.

Con los resultados de esta última correlación, se confirma nuevamente que los dos grupos estudiados, están relacionados por tener una correlación significativa ( $p < 0,001$ ).

Los resultados de las dos correlaciones evaluadas indican que la relación analito (etanol) y metabolito directo (acetaldehído) existe, aunque las muestras analizadas fueron recogidas de cadáveres con diferentes circunstancias de muerte y características forenses.

La siguiente correlación, comparó el resto de grupos cuantitativos: EtG orina, EtG orina y EtG pelo frente a las dos variables evaluadas anteriormente. La medida de las relaciones fueron realizadas por el método de correlaciones de Spearman, dado que este método es el más adecuado cuando se comparan distribuciones no normales.

Correlaciones			
Rho de Spearman		Etanol en sangre	Acetaldehído en sangre
EtGSangre	Coefficiente de correlación	0,850**	0,606**
	Sig. (bilateral)	0,0000	0,0000
EtGOrina	Coefficiente de correlación	0,721**	0,447**
	Sig. (bilateral)	0,0000	0,0001
EtGPelo	Coefficiente de correlación	0,531**	0,327**
	Sig. (bilateral)	0,0000	0,0083
** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas)			

**Tabla 27:** Resultados estadísticos de la correlación de Spearman para los rangos de EtOH sangre y AcCHO sangre, comparados con los rangos para los niveles de EtG orina, EtG orina y EtG pelo, en muestras de cadáveres.

Como se muestra en la tabla 27 todas las comparaciones fueron significativas ( $p < 0,001$ ). Esto se justifica porque los 5 grupos comparados cumplen una relación metabólica, es decir que a partir de una concentración de etanol (EtOH), se producen diferentes niveles de sus metabolitos, el AcCHO y el EtG. Además que las relaciones se mantienen aunque las muestras analizadas fueron recogidas de cadáveres con diferentes circunstancias de muerte y características forenses

### C. Prueba Post-hoc.

Como ya se explicó en el apartado 8 de material y métodos, esta prueba fue evaluada desarrollando dos test estadísticos y que a continuación se detallan.

#### i. Test ANOVA F.

Para este primer test, se compararon las varianzas entre los grupos de variables cuantitativas: EtOH sangre, AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo, para comprobar si existen intervalos de confianza entre estos grupos. La variable objetivo fue EtOH sangre y para una correcta comparación de la varianzas, está fue categorizada en 3 grupos como se muestra en la tabla 28.

Las categorías fueron establecidas con el siguiente criterio: el primer rango estaba integrado por resultados donde no se superó el nivel de alcoholemia permitido en España <sup>(66)</sup>, el siguiente rango estaba integrado por resultados donde se superó la alcoholemia permitida, pero no se alcanzó el nivel de etanol en sangre identificada para la embriaguez plena <sup>(12)</sup> y en el último rango estaban todos los resultados restantes.

Etanol en sangre					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Rangos (g/L)	[0 -0.5)	57	73,1	75,0	75,0
	[0.5 -2)	11	14,1	14,5	89,5
	>= 2	8	10,3	10,5	100,0
	Total	76	97,4	100,0	

**Tabla 28:** Categorización de la variable objetivo (EtOH sangre), para el análisis de las varianzas con un factor (test ANOVA F)

Con las categorías establecidas se procedió a evaluar los intervalos de confianza entre para AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo, relacionados con EtOH. Los resultados se detallan en la siguiente tabla:



ANOVA					
Rangos	Etanol en sangre		Suma de cuadrados	F	Sig.
[0 - 0.5)	Acetaldehído en sangre	Entre grupos	0,0021	14,425	0,00001
[0.5 - 2)		Dentro de grupos	0,0054		
>= 2		Total	0,0075		
	EtG en sangre	Entre grupos	45,676	88,642	0,00000
		Dentro de grupos	18,808		
		Total	64,483		
	EtG en orina	Entre grupos	61999,631	36,411	0,00000
		Dentro de grupos	62151,971		
		Total	124151,601		
	EtG en pelo	Entre grupos	21,637	6,191	0,00356
		Dentro de grupos	106,592		
		Total	128,230		

**Tabla 29:** Resultados de la prueba ANOVA F comparando los valores de AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo en los rangos de EtOH sangre, en muestras forenses.

Con los resultados obtenidos de la prueba ANOVA F (tabla 29), se puede concluir que las relaciones fueron significativas ( $p < 0,001$ ). Esto demuestra que las medias de los grupos no son iguales, por lo que será necesario especificar cuáles son las medias que difieren.

## ii. Test de Duncan.

A continuación se muestran los resultados del test de Duncan para establecer conjuntos de intervalos no significativamente diferentes. Fue importante especificar los rangos con mayor dispersión que influyen en los resultados del test ANOVA F.

En la tabla 30 se detallan los valores estadísticos para el test de Duncan comparando los grupos EtOH sangre y AcCHO sangre. La prueba genera 2 grupos para obtener una significación ( $\alpha = 0,05$ ) buscando subconjuntos homogéneos. Se muestra que solamente cuando las concentraciones de etanol en sangre son menor a 0,5 g/L, las medias de las varianzas son comparables.

Acetaldehído en Sangre			
Duncan <sup>a,b</sup>			
Etanol en sangre (g/L)	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
[0 - 0,5)	57	0,0027	
[0,5 - 2)	11		0,0122
>= 2	8		0,0176
Sig.		1,000	0,1123
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,851.			
b. Los tamaños de grupo no son iguales.			
Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.			
Los niveles de error de tipo I no están garantizados.			

**Tabla 30:** Resultados de la prueba de Duncan, comparando los niveles de AcCHO sangre en los rangos establecidos de EtOH sangre, en muestras de cadáveres.

Como se muestra en las tablas 31 y 32, al comparar los grupos de EtG orina y EtG pelo, respectivamente, frente al grupo de EtOH sangre, se observa que las medias de las varianzas son comparables cuando el nivel de alcoholemia es menor a 0,5 g/L. Igual conclusión que la expuesta anteriormente.

EtG en orina			
Duncan <sup>a,b</sup>			
Etanol en sangre (g/L)	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
[0 - 0,5)	57	6,5228	
>= 2	8		63,6925
[0,5 - 2)	11		78,0026
Sig.		1,0000	0,2178
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,851.			
b. Los tamaños de grupo no son iguales.			
Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.			
Los niveles de error de tipo I no están garantizados.			

**Tabla 31:** Resultados de la prueba de Duncan, comparando los niveles de EtG orina en los rangos establecidos de EtOH sangre, en muestras de cadáveres.

EtG en pelo			
Duncan <sup>a,b</sup>			
Etanol en sangre (g/L)	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
[0 - 0,5)	48	0,1328	
[0,5 - 2)	10		1,4077
>= 2	6		1,5795
Sig.		1,0000	0,7676
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,435.			
b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.			

**Tabla 32:** Resultados de la prueba de Duncan, comparando los niveles de EtG pelo en los rangos establecidos de EtOH sangre, en muestras de cadáveres.

En cambio cuando se relacionan el grupo de la alcoholemia y el de los niveles de EtG en sangre (tabla 33), todos los subconjuntos son significativos, por lo que se concluye que en cualquiera de los rangos establecidos para la alcoholemia, las medias de las varianzas son comparables y por lo tanto la correlación entre estos grupos genera predicciones importantes.

EtG en sangre				
Duncan <sup>a,b</sup>				
Etanol en sangre (g/L)	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
[0 - 0,5)	57	0,0936		
[0,5 - 2)	11		1,2664	
>= 2	8			2,4302
Sig.		1,000	1,000	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,851.				
b. Los tamaños de grupo no son iguales.				
Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.				
Los niveles de error de tipo I no están garantizados.				

**Tabla 33:** Resultados de la prueba de Duncan, comparando los niveles de EtG sangre en los rangos establecidos de EtOH sangre, en muestras de cadáveres.

Los resultados de la prueba de Duncan, para la comparación entre las variables cualitativas: Sexo, Edad, Etiología, Recogida, Dependencia y Diagnóstico, frente a las variables cuantitativas: EtOH sangre, AcCHO sangre, EtG sangre, Etga orina y EtG pelo, ofrecieron una relación significativa, como se detalla en la tabla 33, para el diagnóstico histopatológico y los niveles de EtG.

EtGOrina			
Duncan <sub>a,b</sub>			
Diag_Histopatologico	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Hepatitis	12	4,94363	
Normal	5	9,93687	
Cirrosis	11	10,46118	
Esteatosis	13		54,62578
Sig.		,774	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 8,866.			
b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.			

**Tabla 34:** Resultados de la prueba de Duncan para la comparación de los grupos diagnóstico histopatológico y EtG en orina, de cadáveres.

Con los resultados mostrados en la tabla anterior, se puede inferir que las comparaciones entre el grupo esteatosis y EtG orina generan correlaciones con gran significancia y confianza.

#### D. Prueba de Kruskal–Wallis.

Esta prueba no paramétrica, analizó las varianzas, por jerarquías, de las variables que no siguen una distribución normal. Se contrastó la variable cuantitativa objeto (EtOH sangre) y el resto de variables cuantitativas: AcCHO sangre, EtG orina, EtG orina y EtG pelo.

En la tabla que se muestra a continuación, se detallan los resultados de esta prueba comentada.

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>					
Agrupación		Acetaldehído en sangre	EtG en sangre	EtG en orina	EtG en pelo
[0 - 0.5)	Chi-cuadrado	27,9240	48,3393	34,3055	12,1471
[0.5 - 2)	gl	2	2	2	2
>= 2	Sig. asintótica	0,00000086	0,00000000	0,00000004	0,00230293
a. Prueba de Kruskal - Wallis					
b. Variable de agrupación: Etanol en sangre					

**Tabla 35:** Resultados de la prueba Kruskal–Wallis comparando los niveles de AcCHO sangre, EtG sangre, EtG orina y EtG pelo en los rangos establecidos de EtOH sangre, en muestras de cadáveres.

Con los resultados descritos anteriormente, se confirma, nuevamente, la relación significativa ( $p < 0,001$ ) entre EtOH sangre y las variables cuantitativas de este estudio experimental. Existe una correlación muy importante entre EtOH sangre y EtG sangre.

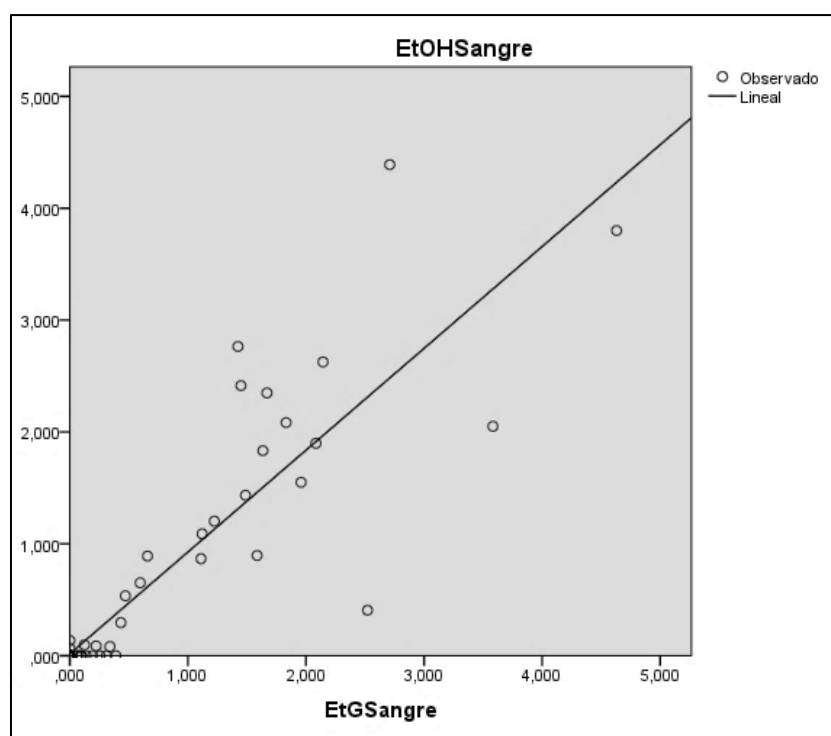
## 5.2. Análisis multivariante

A continuación se detallan los resultados donde se obtuvieron las mejores relaciones de predicción, después del análisis multivariante. Para estas pruebas estadísticas se relacionaron las variables independientes: Sexo, Edad, Etiología, Recogida, Dependencia, Diagnóstico, EtG sangre, Etga orina y EtG pelo frente a la variable objetivo: EtOH sangre, según los requerimientos de cada análisis.

### A. Análisis predictivo por regresiones.

Con el objetivo de encontrar alguna relación expresada como ecuación matemática se relacionaron las variables cuantitativas frente a la variable dependiente.

Luego de este análisis se encontró una relación gráfica y una ecuación lineal de ajuste para la gráfica entre EtOH sangre y EtG sangre. A continuación se detallan estos resultados.



**Figura 43:** Gráfica que representa la recta de predicción para la relación entre EtOH sangre y EtG sangre, en muestras de cadáveres.

El gráfico anterior muestra una relación lineal con significancia entre EtOH sangre y EtG sangre, por lo que se infiere que existe una ecuación matemática para explicar la relación proporcional entre los niveles de alcohol en sangre y los niveles de etilglucurónido en sangre. Analizando la gráfica se concluye que las 2 variables son directamente proporcionales entre ellas.

A continuación se muestra la tabla 36 con los valores que describen los ajustes de la recta graficada y descrita anteriormente. Estos datos permitirán desarrollar la fórmula que representa la gráfica mostrada y con la que se puede predecir la relación entre EtOH sangre y EtG sangre.

Descripción del modelo: EtOH sangre – EtG sangre					
Nombre de modelo		MOD_8			
Variable dependiente	1	EtOHSangre			
Ecuación	1	Lineal			
Variable independiente		EtGSangre			
Constante		Incluido			
Resumen del modelo					
R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación		
0,886	0,785	0,782	0,444		
La variable independiente es EtGSangre.					
ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	53,418	1	53,418	270,683	,000
Residuo	14,604	74	,197		
Total	68,022	75			
La variable independiente es EtGSangre.					
Coeficientes					
	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
EtGSangre	,910	,055	,886	16,452	,000
(Constante)	,017	,058		,285	,776

**Tabla 36:** Tablas donde se muestran los parámetros estadísticos para el ajuste de la recta de predicción lineal de la relación entre EtOH en sangre y EtG sangre, en muestras de cadáveres.

Al analizar los datos descritos, se desarrolla la fórmula que representa la gráfica mostrada y que servirá para predecir las relaciones entre los niveles de EtOH en sangre y EtG en sangre, de cadáveres. La fórmula fue la siguiente:

$$\text{EtOH sangre} = 0,017 + (0,910 \times \text{EtG sangre}) \quad (R^2 = 0,785)$$

---

## **B. Análisis predictivo por árboles de decisión.**

Por esta técnica estadística se relacionó EtOH con las variables: EtG orina, EtG orina, EtG pelo, Sexo, Edad, Etiología, Recogida, Dependencia y Diagnóstico, con el objetivo de encontrar una predicción del comportamiento de la variable dependiente frente a las independientes.

Para la evaluación de cada árbol de decisión es importante relacionar los nodos que se originan del nodo principal. El nodo principal representa a los niveles de EtOH, categorizados de igual forma como para el test ANOVA F, también será importante la significancia (p) que se predice cuando se segmenta un nodo.

A continuación se muestran los mejores resultados obtenidos según dos técnicas diferentes para el crecimiento del árbol de predicción.

### **A. Método de crecimiento CHAID exhaustivo.**

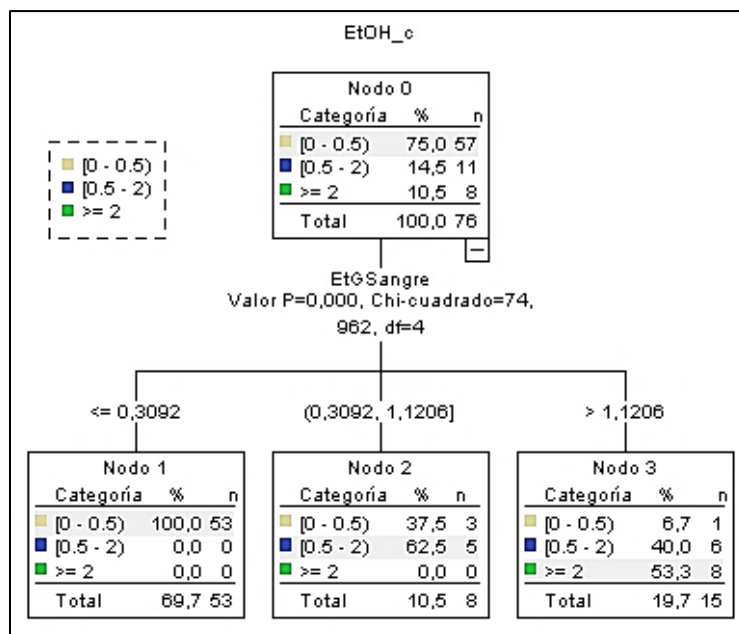
Está método se fundamenta en el análisis chi cuadrado inicial. Los resultados obtenidos por este método son evaluados a continuación, después de relacionar los tres nodos segmentados a partir del nodo inicial

Con una significancia ( $p < 0,001$ ) y después de categorizar todos los casos según la alcoholemia se puede predecir que (figura 76):

- a. Cuando los niveles de EtG en sangre son menores de  $0,3092\mu\text{g/mL}$  (nodo 1), todos los casos deben tener un nivel de alcoholemia menor a  $0,5\text{ g/L}$ .
- b. Si los niveles de EtG en sangre están dentro del rango entre  $0,3092\text{ }\mu\text{g/mL}$  y  $1,1206\mu\text{g/mL}$  (nodo 2), el 37,5% de los casos tendrán una alcoholemia menor a  $0,5\text{ g/L}$  y 62,5% de los casos tendrán una alcoholemia entre  $0,5\text{ g/L}$  y  $2\text{ g/L}$
- c. Cuando los valores de EtG en sangre son superiores a  $1,1206\mu\text{g/mL}$  (nodo 3), el nivel de alcoholemia se dispersa en 6,7%, 40% y 53,3% respectivamente para cada rango de alcoholemia descrito.



La predicción permite inferir un suceso donde si la alcoholemia aumenta, los niveles de EtG en sangre aumentarán gradualmente.



**Figura 44:** Gráfica donde se representa el árbol de decisión obtenido por el método CHAID exhaustivo, que representa una secuencia de sucesos que relacionan la variable dependiente (EtOHsangre) y la variable independiente (EtGsangre).

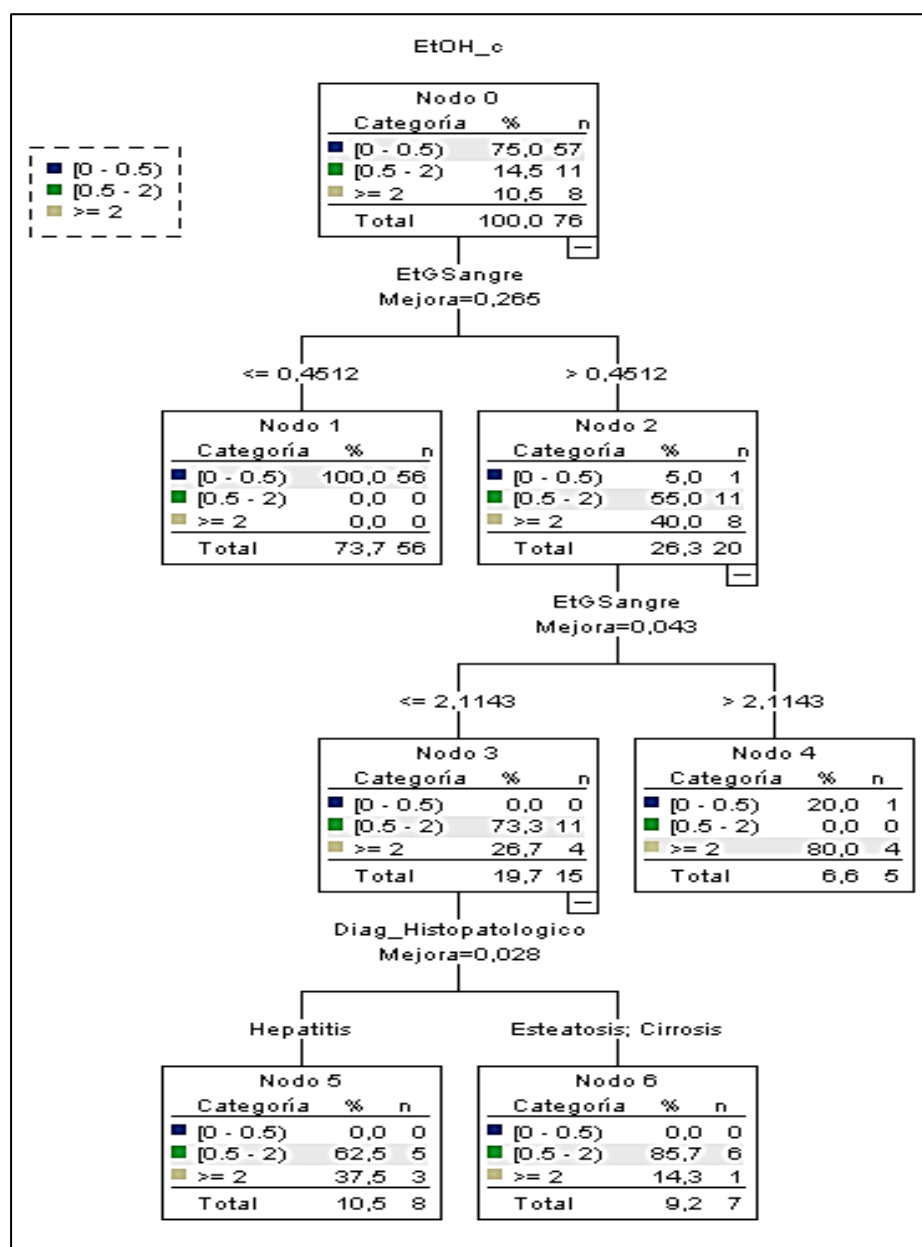
En la siguiente tabla se puede comprobar que el análisis estadístico de esta prueba indica que existe un 86,8% de probabilidad que esta predicción se pueda generalizar.

Clasificación				
Observado	Pronosticado			Porcentaje correcto
	[0 - 0.5)	[0.5 - 2)	>= 2	
[0 - 0.5)	53	3	1	93,0%
[0.5 - 2)	0	5	6	45,5%
>= 2	0	0	8	100,0%
Porcentaje global	69,7%	10,5%	19,7%	86,8%
Método de crecimiento: EXHAUSTIVE CHAID				
Variable dependiente: EtOH_c				

**Tabla 37:** Resultados del pronóstico general, por el método de crecimiento CHAID exhaustivo, para la relación entre EtOH en sangre y EtG sangre, en muestras de cadáveres.

## B. Método de crecimiento CRT.

Este método relaciona las variables relacionadas estimando la reducción de la incertidumbre o variabilidad (mejora). Al igual que con el método anterior, la evaluación del correspondiente árbol de decisión se realiza a partir del nodo inicial y de los nodos que se van segmentando. En este caso, solo hay segmentación si la mejora disminuye.



**Figura 45:** Gráfica donde se representa el árbol de decisión obtenido por el método CRT, que representa una secuencia de sucesos que relacionan la variable dependiente (EtOH sangre) y las variables independientes (EtG sangre y Diagnóstico)

La predicción de sucesos según del árbol que se muestra en la figura 77, relaciona dos variables independientes: EtG en sangre y el diagnóstico histopatológico con la alcoholemia. La información obtenida predice que:

- a. Después de categorizar a todos los casos según la alcoholemia, de acuerdo a los rangos ya comentados, los casos pueden dividirse en 2 grupos. Cuando el nivel de EtG en sangre es menor o igual a 0,4512  $\mu\text{g/mL}$ , el 100 % de los casos tendrán una alcoholemia inferior a 0,5g/L, mientras que si los valores de EtG son mayores a 0,4512 $\mu\text{g/mL}$ , el total de casos se dispersa en 5%, 55% y 40% respectivamente para los rangos categorizados de la alcoholemia. Este análisis tiene un nivel de mejora =0,265.
- b. Según el nodo 2, si los niveles de EtG en sangre están en el rango de 0,4515 $\mu\text{g/mL}$  y 2,1143  $\mu\text{g/mL}$ , los casos se dispersan en proporciones iguales a 0%, 73,3 % y 26,7% respectivamente para los rangos de alcoholemia categorizados. Si los valores son mayores que 2,1143 $\mu\text{g/mL}$ , los casos se dispersan en proporciones iguales a 20%, 0% y 80% según la categorización de la alcoholemia conocida. Esta predicción tiene un nivel de mejora = 0,043, por lo que la significancia a descendido.

Hasta este momento, la predicción permite inferir que cuando la alcoholemia aumenta, los niveles de EtG en sangre aumentan. La misma predicción que con el método descrito anteriormente.

Con este método de predicción se puede inferir, hasta el momento y como se deatlla en la tabla 38, que existe un 93,4% de probabilidad para que este suceso se pueda generalizar.

Clasificación				
Observado	Pronosticado			Porcentaje correcto
	[0 - 0.5)	[0.5 - 2)	$\geq 2$	
[0 - 0.5)	56	0	1	98,2%
[0.5 - 2)	0	11	0	100,0%
$\geq 2$	0	4	4	50,0%
Porcentaje global	73,7%	19,7%	6,6%	93,4%
Método de crecimiento: CRT				
Variable dependiente: EtOH_c				

**Tabla 38:** Resultados del pronóstico general, por el método de crecimiento CRT, para la relación entre EtOH en sangre y EtG sangre, en muestras de cadáveres.

---

A partir del nodo 3 del árbol descrito en la figura 77 la predicción del árbol de decisión incluye la variable de la probable hepatopatía. A partir de los últimos nodos podemos indicar:

- c. Cuando los niveles de EtG en sangre son menores o iguales a 2,1143  $\mu\text{g/mL}$ , el diagnóstico de hepatitis se puede relacionar, en un 62,5%, con alcoholemias que pueden variar entre 0,5 g/L y 2 g/L y en un 37,5 % con alcoholemias mayor a 2 g/L.
- d. En ese mismo rango de EtG en sangre, un 85,7% se relaciona con alcoholemias que pueden variar entre 0,5 g/L y 2 g/L y en un 14,3 % con alcoholemias superiores a 2 g/L; el problema es que no hay seguridad de predecir si el diagnóstico es esteatosis o cirrosis.

---

## **Conclusiones**

---

## **1. Conclusiones según el primer objetivo específico.**

*Valorar el consumo agudo de alcohol utilizando la alcoholemia, cuantificada por cromatografía de gases con un detector de ionización de la llama y acoplado a un automuestreador de espacio en cabeza.*

- Los resultados de alcoholemia en cadáveres judiciales del Instituto Anatómico Forense de Madrid, permiten la valoración de la ingesta reciente de alcohol.
- Además, la concentración de acetaldehído en sangre mejora la valoración de la ingesta reciente de alcohol porque su correlación con la concentración de etanol en sangre es estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

## **2. Conclusiones según el segundo objetivo específico.**

*Valorar el consumo agudo o crónico de alcohol utilizando los niveles de etilglucurónido en sangre, orina y pelo, tras su determinación por cromatografía líquida acoplado a un detector de masas en tándem.*

- Presencia de etilglucurónido en sangre, niveles elevados de etilglucurónido en orina y circunstancias de la muerte, son herramientas para la valoración forense del consumo abusivo y agudo de alcohol, cuando el caso se analiza de forma individual.
- Se confirma la presencia de etilglucurónido en pelo como marcador para la valoración forense del consumo crónico de alcohol en cadáveres del Instituto Anatómico Forense de Madrid.
- La relación general de los niveles de etilglucurónido en sangre, orina y pelo para la valoración del consumo agudo o crónico de alcohol no es estadísticamente significativa.

---

### **3. Conclusiones según el tercer objetivo específico.**

*Analizar las relaciones entre alcoholemia y etilglucurónido en sangre, orina y pelo como estrategia para la valoración del consumo agudo o crónico de alcohol.*

- La relación entre etanol en sangre y etilglucurónido en sangre, con un nivel de significación ( $\alpha=0,05$ ), es la mejor estrategia para la valoración del consumo agudo de alcohol en cadáveres del Instituto Anatómico Forense de Madrid.
- La relación entre etanol en sangre y etilglucurónido en orina, con un nivel de significación ( $\alpha=0,05$ ), es valorable con el consumo abusivo de alcohol cuando el nivel de alcoholemia es menor a 0,5g/L. Cuando la alcoholemia aumenta la relación no es estadísticamente significativa en cadáveres.
- La relación entre etanol en sangre y etilglucurónido en pelo, es una estrategia para la valoración del consumo crónico de alcohol cuando el nivel de alcoholemia es menor a 0,5g/L, por tener un buen nivel de significación ( $\alpha=0,05$ ). Cuando la alcoholemia aumenta, la relación no es estadísticamente significativa en cadáveres.

### **4. Conclusiones según el cuarto objetivo específico.**

*Relacionar alcoholemia y etilglucurónido con las circunstancias de la muerte para aumentar los criterios de la valoración del consumo de alcohol.*

- La valoración forense del consumo de alcohol relacionando las circunstancias de la muerte y los resultados analíticos de etanol y etilglucurónido es factible cuando el análisis se realiza de forma individual, sin comparación entre casos.
- La inferencia general de la relación entre las circunstancias de la muerte, y los resultados de etanol y etilglucurónido en muestras de cadáveres judiciales no es estadísticamente significativa.

---

## **5. Conclusiones según el quinto objetivo específico.**

*Analizar las relaciones entre alcoholemia, niveles de etilglucurónido y diagnóstico hepático como estrategia para diferenciar el consumo agudo del consumo crónico de alcohol.*

- La valoración forense, en cadáveres, del consumo agudo de alcohol relacionando etanol en sangre, etilglucurónido en sangre y diagnóstico hepático se puede realizar de forma individual por caso.
- La valoración forense del consumo de crónico de alcohol por la presencia de etilglucurónido en pelo, se confirma con la presencia de hepatopatías en cada caso.
- La relación entre los niveles de etilglucurónido en orina y la presencia de esteatosis hepática, con un nivel de significación ( $\alpha=0,05$ ), es una estrategia importante para la valoración forense del consumo abusivo de alcohol en cadáveres.
- Alcoholemia positiva y etilglucurónido en sangre dentro del rango (0,4512  $\mu\text{g/mL}$  y 2,1143  $\mu\text{g/mL}$ ), permiten predecir la existencia de hepatopatías alcohólicas en cadáveres con una importante probabilidad estadística.

## **6. Conclusiones según el objetivo general.**

*Comprobar que el consumo abusivo de alcohol se puede diferenciar entre agudo o crónico, relacionando alcoholemia, niveles de etilglucurónido y el diagnóstico hepático, en muestras forenses del Instituto Anatómico Forense de Madrid.*

- En cadáveres judiciales, el consumo abusivo de alcohol es agudo cuando la alcoholemia es positiva, el etilglucurónido en sangre es positivo y los niveles de etilglucurónido en orina son elevados.
- Se confirma que el consumo abusivo de alcohol es crónico cuando etilglucurónido en pelo es positivo en los primeros 3 cm proximales y se confirma con un diagnóstico histopatológico en cadáveres del Instituto Anatómico Forense de Madrid.



---

## **7. Conclusiones según la hipótesis.**

*El consumo abusivo de alcohol se confirma cuando en el cadáver los resultados analíticos son positivos para alcoholemia y metabolitos del etanol.*

- La valoración forense, en cadáveres, del consumo abusivo de alcohol queda confirmada cuando alcoholemia, acetaldehído en sangre y etilglucurónido en sangre, orina y pelo son positivas.
- Cuando alguno de los ensayos analíticos es negativo, incluir el análisis de las circunstancias de la muerte es una correcta estrategia para mejorar la valoración forense de consumo de alcohol en cadáveres.

---

## Referencias Bibliográficas

---

# Referencias Bibliográficas

---

- 1 World Health Organization. Global strategy to reduce the harmful use of alcohol [Internet]. Suiza: Grupo Científico de la OMS; 2010. [acceso 2013]. Disponible en: [http://www.who.int/substance\\_abuse/msbalestrategy.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/msbalestrategy.pdf)
- 2 World Health Organization. Global status report on alcohol and health [Internet]. Suiza: Grupo Científico de la OMS; 2011. [acceso 2013]. Disponible en: [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/msbgsruprofiles.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf)
- 3 Definición, designación, presentación, etiquetado y protección de la indicación geográfica de bebidas espirituosas. Reglamento N° 110/2008. Diario Oficial de la Unión Europea, L 39, (13 de febrero de 2008).
- 4 Sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos y por el que se modifican el Reglamento, n° 1601/91 del Consejo, los Reglamentos (CE) n° 2232/96 y (CE) n°110/2008 y la Directiva 2000/13/CE. Reglamento N° 1334/2008. Diario Oficial de la Unión Europea, L 354, (31.12.2008).
- 5 World Health Organization. Glosario de términos de alcohol y drogas. [Internet]. España: Ministerio de Sanidad y Consumo de España – Edición en Español; 1994. [acceso 2015]. Disponible en: [http://www.who.int/substance\\_abuse/terminology/lexicon\\_alcohol\\_drugs\\_spanish.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/terminology/lexicon_alcohol_drugs_spanish.pdf)
- 6 Costa M. Introducción a la Economía Laboral. 1° Ed. Barcelona – España: Universitat de Barcelona; 2005.

- 
- 
- 7** Federación Española de Bebidas Espirituosas. Memoria Anual de Actividades [Internet]. España: F.E.B.E; 2011. Disponible en: <http://www.febe.es/cliente/files/memoria2011.pdf>.
- 8** American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR<sup>®</sup>. 4° ed. Washington: American Psychiatric Association; 2000.
- 9** American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5<sup>®</sup>. 5° ed. Arlington, Va.: American Psychiatric Association; 2013.
- 10** Elisardo B. Trastornos relacionados con sustancias y trastornos adictivos. Cuaderno Médico de Psicopatología. 2014; 110: 58 – 61.
- 11** Atkins PW, Jones L. Principios de química: los caminos del descubrimiento. 5° ed. Buenos Aires - Argentina: Médica Panamericana; 2012.
- 12** Ministerio de Empleo y Seguridad Social. Fichas Internacionales de Seguridad Química [Internet]. España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; 2005 [acceso 2014]. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0044.pdf>
- 13** Macy R. Química Orgánica Simplificada. 1° Ed. Barcelona-España: Editorial Reverté; 2005.
- 14** Gisbert JA, Villanueva E. Medicina Legal y Toxicología. 6° Ed. Barcelona - España: Masson; 2004.
- 15** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) [Internet]. Agentes clasificados por la IARC. Francia: Organización Mundial de la Salud; [actualizado el 24 de agosto del 2015; acceso 2015]. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>

- 
- 
- 16** Ministerio de Empleo y Seguridad Social. Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional de etanol [Internet]. España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; 2013 [acceso 2015]. Disponible en: [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/LEP%20 VALORES%20 LIMITE/Doc\\_Toxicologica/Capitulos%2072\\_82/Ficheros/DLEP%2079.%20etanol.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/LEP%20 VALORES%20 LIMITE/Doc_Toxicologica/Capitulos%2072_82/Ficheros/DLEP%2079.%20etanol.pdf)
- 17** Ministerio de Empleo y Seguridad Social. Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición durante el trabajo a los agentes cancerígenos o mutágenos. [Internet]. España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; [acceso 2015]. Disponible en: [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/Agentes\\_cancerigenos.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/Agentes_cancerigenos.pdf)
- 18** Repetto M., Sanz P. Glosario de Terminos Toxicologicos. Asociacion Española de Toxicologia. 1995.
- 19** Olga Larrubia Muñoz y Francisco J. Pérez Domínguez. Fármacos y embarazo. Terapéutica. 2010: 66-71.
- 20** Morrison RT, Boyd RN. Química Orgánica. 5ª Ed. México: Ed. Addison Wesley Longman de México, S.A. de C.V.; 1998.
- 21** Griffin RW. Química Orgánica Moderna. s/ Ed. Barcelona - España: Ed. Reverté; 1981.
- 22** Alberts, B., Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al., Introducción a la Biología Celular / Essential Cell Biology. 3º Ed. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2011.

- 
- 
- 24** Curtis H, Barnes N, Massarini A, Schnerck A. Biología. 7º Ed. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2008.
- 25** Barnaby JR. Fisiología del ejercicio físico y del entrenamiento. 1º Ed. Barcelona-España: Editorial Paidotribo; 2002
- 26** Pares R, Juarez A. Bioquímica de los Microorganismos. 1º Ed. Barcelona-España: Editorial Reverté; 1997.
- 27** Varnam AH, Sutherland JP, Dalmau JME. Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología, Vol. 2. 1º Ed. Zaragoza-España: Editorial Acribia; 1996.
- 28** Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio. Boletín Oficial del Estado, nº 22, (24 de agosto de 1999).
- 29** Valencia F. Enología: Vinos, aguardientes y licores. 1º Ed. Málaga-España: Publicaciones Vértice; 2010.
- 30** Reglamento sobre la definición, descripción, presentación, etiquetado y protección de las indicaciones geográficas de los productos vitivinícolas aromatizados. Reglamento N° 251/2014 de 26 de febrero de 2014. Diario Oficial de la Unión Europea, L 84, (20 de marzo de 2014).
- 31** Herrera C, Bolaños N, Lutz G. Química de alimentos: Manual de laboratorio, 1º ed. Costa Rica: Comisión Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2003.
- 32** Grosch W, Schieberle P. Química de los alimentos. 3º Ed. Zaragoza-España: Editorial Acribia; 1997.
- 33** Skoog D, West D, Holler FJ. Fundamentos de Química Analítica. 4º Ed. Barcelona-España: Editorial Reverté; 2003.

- 
- 
- 34** Robinson KA, Robinson JF. Análisis instrumental. 1º Ed. Madrid - España: Pearson Educación; 2000.
- 35** Diccionario de la Lengua Española. 23º Ed. España: Real Academia de la Lengua Española; 2015. Alcoholemia.
- 36** Winekb T, Winek CL, Wahba WW. The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration. *Forensic Sci Int.* 1996; 78(3):179-185.
- 37** Monteiro C, Franco JM, Proença P, Castañera A, Claro A, Vieira DN, et al. Qualitative and quantitative analysis of a group of volatile organic compounds in biological samples by HS-GC/FID: application in practical cases. *Forensic Sci Int.* 2014; 243: 137–143.
- 38** Freiría MJ, Alvarez A, Lorenzo RA, Racamonde FF, Rodríguez A. Aplicaciones de la técnica denominada espacio de cabeza. *Revista Cubana de Química.* 1998; X (1-2).
- 39** López JL. Alcohol y Tráfico. Sevilla–España: Editorial MAD; 2004.
- 40** Orden, ITC/3707/2006 de 22 de noviembre, por la que se regula el control metrológico del Estado de los instrumentos destinados a medir la concentración de alcohol en el aire espirado. *Boletín Oficial del Estado*, nº 292, (7 de diciembre de 2006).
- 41** Alhambra MP, Segura L. El alcohol: cuestiones jurídico – médicas. Granada-España: Editorial Comares; 2001.
- 42** Dubowsky KM. Absorption, distribution and elimination of alcohol: highway safety aspects. *J Stud Alcohol Suppl.* 1985; 10:98-108
- 43** Garriot JC. Medico Legal Aspects of Alcohol determination in biological specimens. Ed Lawrys and Judges; 1993

- 
- 
- 44** Jones AW, Norberg A, Hahn RG. Concentration-time profiles of ethanol in arterial and venous blood and expired breath during and after intravenous infusion. J. Forensic Sci. 1997; 42(6): 1088-94.
- 45** Segura L. Cuestiones prácticas para la valoración médico-legal de alcohol etílico en medios biológicos (Parte I). Revista Española de Daño Corporal. 1998; 3 (5): 57-64.
- 46** Segura L. Cuestiones prácticas para la valoración médico-legal de alcohol etílico en medios biológicos (Parte II). Revista Española de Daño Corporal. 1998; 3 (6): 71-79.
- 47** Segura L. Fundamentos del análisis toxicológico forense. Interpretación de los resultados, valoración médico forense de la alcoholemia. En: José Cabrera Forneiro, editor. Medicina Legal en Drogodependencias. Madrid-España: Ediciones Hartcourt. 1999; 262-295.
- 48** Macionis JJ, Plummer K. Sociología. 4º Ed. Madrid-España: Pearson Educación; 2011.
- 49** Braunstein, N. Clasificar en Psiquiatría. 1ª Ed. México: Siglo XXI Editores; 2013.
- 50** Diccionario de la Lengua Española. 23º Ed. España: Real Academia de la Lengua Española; 2015. Alcoholismo.
- 51** Pragst F, Rothe M, Moench B, Hastedt M, Herre S, Simmert D. Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: Interpretation and advantages. . Forensic Sci Int. 2010; 196: 101-110.
- 52** Jurado C. Marcadores de consumo de alcohol en muestras de pelo. Cuad Med Forense. 2009; 15(58): 265-278.



- 
- 
- 53** Society of Hair Testing. Consensus for the Use of Alcohol Markers in Hair for Assessment of both Abstinence and Chronic Excessive Alcohol Consumption. [Internet] Burdeos: SOHT; 2014 [acceso 2014]. Disponible en: <http://soht.org/images/pdf/2014%20Alcohol%20markers%20revision%2013JUN14%20FINAL.pdf>
- 54** Diccionario de la Lengua Española. 23º Ed. España: Real Academia de la Lengua Española; 2015. Dependencia.
- 55** Diccionario de la Lengua Española. 23º Ed. España: Real Academia de la Lengua Española; 2015. Incapacidad.
- 56** Harwood RH, Sayer AA, Hirschfeld M. Current and future worldwide prevalence of dependency, its relationship to total population and dependency ratios. Bulletin of the World Health Organization. 2004; 82(4): 251 – 258.
- 57** Organización Mundial de la Salud. Neurociencia del consumo y dependencia de sustancias psicoactivas; resumen. Suiza: OMS 2004. [acceso 2014]. Disponible en: [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/en/Neuroscience\\_S.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/en/Neuroscience_S.pdf).
- 58** Pons X. Materiales para la intervención social y educativa ante el consumo de drogas. 1ºEd. Alicante-España: Editorial Club Universitario; 2006.
- 59** Sociedad Española de Toxicomanías. Tratado SET de Trastornos adictivos. 1ºEd. Madrid-España: Editorial Médica Panamericana; 2006.
- 60** Lorenzo P, Ladero JM, Leza JC, Lizosain I. Drogodependencias. 3ºEd. Madrid-España: Editorial Médica Panamericana; 2009.
- 61** Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Robbins Patología humana. 8ºEd. Barcelona-España: Elsevier; 2008. XII.

- 
- 62** Roldán J, Frauca C, Dueñas A. Intoxicación por alcoholes. Anales Sis San Navarra. 2003; 26 (1): 129-139 Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272003000200007&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200007&lng=es)
- 63** Grace CON, Neuhaus D. Alerta al alcohol: Childrens Press; 1991.
- 64** López T, Beracieto J, Beracieto L, Martín T. Alcohol y enfermedades. Artículo de revisión. Mediciogo. 2008; 14(1). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol14\\_supl1\\_08/revisiones/r6\\_v14\\_supl108.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol14_supl1_08/revisiones/r6_v14_supl108.htm)
- 65** Stevens A, Lowe JS, Merigo Jane JA, Scott I. Patología clínica. México, D.F.: Manual Moderno; 2011.
- 66** Código Penal y Legislación Complementaria, Boletín Oficial del Estado – Ministerio de Justicia, 19 octubre 2015.
- 67** Ley sobre Tráfico, Circulación de Vehículos a Motor y Seguridad Vial. Real Decreto Legislativo 339/1990 de 2 de marzo. Boletín Oficial del Estado, nº. 63, (14 de marzo de 1990).
- 68** Reglamento General de Circulación. Real Decreto 1428/2003, de 21 de noviembre. Boletín Oficial del Estado, nº 306, (23 de diciembre de 2003).
- 69** International Center for Alcohol Policies. Blood Alcohol Concentration Limits Worldwide. ICAP Reports 11. 2002.
- 70** Klaassen C, Watkins J Casaret L, Doull J. Manual de Toxicología: La ciencia básica de los tóxicos. México: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
- 71** Mencías Rodríguez M. Manual de Toxicología Básica. Madrid-España: Ediciones Díaz de Santos. Editores: Emilio Mencías Rodríguez, Luis Manuel Mayero Franco; 2000.

- 
- 
- 72** Hernández-Tobías A, Julián-Sánchez A, Piña E, Riveros-Rosas H. Natural alcohol exposure: Is ethanol the main substrate for alcohol dehydrogenases in animals? *Chem Biol Interact.* 2011; 191(1–3):14-25.
- 73** Takagi T, Alderman J, Lieber CS. In vivo roles of alcohol dehydrogenase (ADH), catalase and the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) in deermice. *Alcohol.* 1985; 2(1):9-12.
- 74** Gil Á, Sánchez de Medina Contreras F. Tratado de nutrición. T. I, Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 2º Ed. Madrid-España: Médica Panamericana; 2010.
- 75** García-Rodríguez JA. Manual de estudios sobre el alcohol. Madrid-España: Editorial EDAF; 2001.
- 76** Lieber CS. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab Rev.* 2004; 36(3-4):511-29.
- 77** Jiménez MR, Repetto KG. Toxicología Fundamental. Madrid-España: Díaz de Santos. 1997.
- 78** Calabuig JA. Medicina legal y toxicología. Barcelona-España: Elsevier-Masson. Editor: Enrique Villanueva Cañadas. 2004.
- 79** Laposota M. Assesment of etanol intake. Current issues and new assays on the horizon. *Am. J. Clin. Phatol.* 1999; 112: 443-450.
- 80** Musshoff F, Daldrup T. Determination of biological markers for alcohol abuse. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 713(1): 245 – 264
- 81** Pragst F, Spiegel K, Sporkert F, Bohnenkamp M. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. *Forensic Sci Int.* 2000; 107: 201 – 223.

- 
- 
- 82** Juha R, De Giorgio F, Bortolotti F, Tagliaro F. Objective post-mortem diagnosis of chronic alcohol abuse – A review of studies on new markers. *Leg Med (Tokyo)*. 2008; 10: 229 – 235.
- 83** Niemela O. Biomarkers in alcoholism. *Clin Chim Acta*. 2007; 377(1-2):39-49.
- 84** Manzardo AM, McGuire A, Butler MG. Clinically relevant genetic biomarkers from the brain in alcoholism with representation on high resolution chromosome ideograms. *Gene*. 2015; 560(2):184-94.
- 85** Kintz P, Nicholson D. Testing for ethanol markers in hair: Discrepancies after simultaneous quantification of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters. *Forensic Sci Int*. 2014; 243:44-6.
- 86** Suesse S, Pragst F, Mieczkowski T, Selavka CM, Elian A, Sachs H, *et al*. Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases. *Forensic Sci Int*. 2012; 218(1–3):82-91.
- 87** Pragst F. Interpretation problems in a forensic case of abstinence determination using alcohol markers in hair. *Forensic Sci Int*. 2012; 217(1–3):e4-e7.
- 88** Helander A, Beck O. Ethyl Sulfate: A Metabolite of Ethanol in Humans and a Potential Biomarker of Acute Alcohol Intake. *J Anal Toxicol*. 2005; 29(5):270-4.
- 89** Helander A, Péter O, Zheng Y. Monitoring of the Alcohol Biomarkers PEth, CDT and EtG/EtS in an Outpatient Treatment Setting. *Alcohol Alcohol*. 2012;47(5):552-7.
- 90** Politi L, Zucchella A, Morini L, Stramesi C, Poletti A. Markers of chronic alcohol use in hair: Comparison of ethyl glucuronide and cocaethylene in cocaine users. *Forensic Sci Int*. 2007;172(1):23-7.

- 
- 
- 91** Harris DS, Everhart ET, Mendelson J, Jones RT. The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. *Drug Alcohol Depend.* 2003;72(2):169-82.
- 92** Grassi MC, Cioce AM, Giudici FD, Antonilli L, Nencini P. Short-term efficacy of Disulfiram or Naltrexone in reducing positive urinalysis for both cocaine and cocaethylene in cocaine abusers: A pilot study. *Pharmacol Res.* 2007; 55(2):117-21.
- 93** Varga A, Hansson P, Lundqvist C, Alling C. Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: Comparison with other markers. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; 22(8):1832-7
- 94** Bendroth P, Kronstrand R, Helander A, Greby J, Stephanson N, Krantz P. Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *Forensic Sci Int.* 2008; 176(1):76-81.
- 95** Varga A, Hansson P, Lundqvist C, Alling C. Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: Comparison with other markers. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; 22(8):1832-7.
- 96** Lachenmeier DW, Gill JS, Chick J, Rehm J. The total margin of exposure of ethanol and acetaldehyde for heavy drinkers consuming cider or vodka. *Food Chem Toxicol.* 2015; 83:210-4.
- 97** Dostert P, Strolin Benedetti M, Dordain G, Vernay D. Urinary elimination of salsolinol enantiomers in alcoholics. *J Neural Transmission.* 1991; 85(1):51-9.
- 98** Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB. Substance abuse: a comprehensive textbook. 4<sup>o</sup> Ed. Baltimore - USA: Williams & Wilkins; 2005. Xxvi:1110.

- 
- 
- 99** Watson RR. Diagnosis of alcohol abuse. Boca Ratón, Fla.: CRC Press; 1989: 275.
- 100** Suárez LA, Arellano R y Bernal E. Metanol como marcador de abuso en el consumo de alcohol en muestras forenses. *Rev. Toxicol.* 2009; 26: 137-140.
- 101** Iffland R, Balling MP, Borsch G, Herold C, Kaschade W, Loffler T, *et al.* Evaluation of an increased blood level of GGT, CDT, methanol, acetone and isopropanol in alcohol intoxicated automobile drivers. Alcoholism indicators instead of medical-psychological examination]. *Blutalkohol.* 1994; 31(5):273-314.
- 102** Bilzer N, Penners BM, Conrad A. Methanol kinetics in chronic alcoholism. *Blutalkohol.* 1991; 28(6):377-92.
- 103** Kang JH, Salsolinol, a Tetrahydroisoquinoline Catechol Neurotoxin, Induces Human Cu,Zn-superoxidie Dismutase Modificaiton. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 2007; 40 (5):684-689.
- 104** Johnson RD, Lewis RJ, Canfield DV, Dubowski KM, Blank CL. Utilizing the urinary 5-HTOL/5-HIAA ratio to determine ethanol origin in civil aviation accident victims. *J Forensic Sci.* 2005; 50(3):670-5.
- 105** Beck O, Helander A. 5-Hydroxytryptophol as a marker for recent alcohol intake. *Addiction.* 2003; 98:63-72.
- 106** Helander A, Beck O, Jones AW. Laboratory testing for recent alcohol consumption: Comparison of ethanol, methanol, and 5-hydroxytryptophol. *Clin Chem.* 1996; 42(4):618-24.
- 107** Baros AM, Wright TM, Latham PK, Miller PM, Anton RF. Alcohol consumption, %CDT, GGT and blood pressure change during alcohol treatment. *Alcohol Alcohol.* 2008; 43(2):192-7.

- 
- 
- 108** Danielsson J, Kangastupa P, Laatikainen T, Aalto M, Niemela O. Dose- and Gender-dependent Interactions between Coffee Consumption and Serum GGT Activity in Alcohol Consumers. *Alcohol Alcohol*. 2013;48(3):303-7.
- 109** Breitling LP, Arndt V, Drath C, Brenner H. Liver Enzymes: Interaction Analysis of Smoking with Alcohol Consumption or BMI, Comparing AST and ALT to gamma-GT. *PLoS One*. 2011; 6(11): e27951
- 110** Liangpunsakul S, Qi R, Crabb DW, Witzmann F. Relationship Between Alcohol Drinking and Aspartate Aminotransferase:Alanine Aminotransferase (AST:ALT) Ratio, Mean Corpuscular Volume (MCV), Gamma-Glutamyl Transpeptidase (GGT), and Apolipoprotein A1 and B in the US Population. *J Stud Alcohol Drugs*. 2010; 71(2):249-52.
- 111** Reid C, Concato J, Guo Z, O'Connor PG. Are MCV, AST, ALT and the AST/ALT ratio useful tests for alcohol disorders in older persons? *J Gen Intern Med*. 2003;18:198.
- 112** Conigrave KM, Degenhardt LJ, Whitfield JB, Saunders JB, Helander A, Tabakoff B, et al. CDT, GGT, and AST as markers of alcohol use: The WHO/ISBRA Collaborative Project. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002; 26(3):332-9.
- 113** Rainio J, De Paoli G, Druid H, Kauppila R, De Giorgio F, Bortolotti F, *et al*. Post-mortem stability and redistribution of carbohydrate-deficient transferrin (CDT). *Forensic Science International*. 2008; 174(2–3):161-5.
- 114** Bergström JP, Helander A. Influence of alcohol use, ethnicity, age, gender, BMI and smoking on the serum transferrin glycoform pattern: Implications for use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker. *Clinica Chim Acta*. 2008; 388(1–2):59-67.

- 
- 
- 115** Berger D, Williams EC, Bryson CL, Rubinsky AD, Bradley KA. Alcohol questionnaires and HDL: Screening scores as scaled markers of alcohol consumption. *Alcohol*. 2013; 47(6):439-45.
- 116** Wakabayashi I, Groschner K. Modification of the association between alcohol drinking and non-HDL cholesterol by gender. *Clinica Chim Acta* 2009; 404(2):154-9.
- 117** Teresiński G, Buszewicz G, Madro R. The influence of ethanol on the level of ketone bodies in hypothermia. *Forensic Sci Int*. 2002; 127(1–2):88-96.
- 118** Bouteldja N, Andersen LT, Møller N, Gormsen LC. Using positron emission tomography to study human ketone body metabolism: A review. *Metabolism*. 2014; 63(11):1375-84.
- 119** Roine RP, Nykanen I, Ylikahri R, Heikkila J, Suokas A, Salaspuro M. Effect of alcohol on blood dolichol concentration. *Alcohol Clin Exp Res*. 1989; 13(4):519-22.
- 120** Carroll KK, Guthrie N, Ravi K. Dolichol: function, metabolism, and accumulation in human tissues. *Biochem Cell Biol*. 1992; 70(6):382-4.
- 121** Schmitt G1, Aderjan R, Keller T, Wu M. Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data, and determination in serum and urine. *J Anal Toxicol*. 1995; 19(2):91-4.
- 122** Wright TH, Ferslew KE. Biotransformation of ethanol to ethyl glucuronide in a rat model after a single high oral dosage. *Alcohol*. 2012; 46(2):159-64.
- 123** Foti RS, Fisher MB. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int*. 2005; 153(2-3):109-16.



- 
- 
- 124** Křivánková L, Caslavská J, Maláškova H, Gebauer P, Thormann W. Analysis of ethyl glucuronide in human serum by capillary electrophoresis with sample self-stacking and indirect detection. *J Chromatogr A*. 2005; 1081(1):2-8.
- 125** Høiseth G, Bernard JP, Karinen R, Johnsen L, Helander A, Christophersen AS, *et al.* A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: Applications to forensic toxicology. *Forensic Sci Int*. 2007; 172(2–3):119-24.
- 126** Politi L, Leone F, Morini L, Poletti A. Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: A review. *Anal Biochem*. 2007 ; 368(1):1-16.
- 127** I. Janda, A. Alt, Improvement of ethyl glucuronide determination in human urine and serum samples by solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B*. 2001; 758: 229–234.
- 128** Weinmann H, Schaefer P, Thierauf A, Schreiber A, Wurst F.M. Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid chromatography/ electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines, *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 2004; 15: 188–193.
- 129** Politi L, Morini L, Groppi A, Poloni V, Pozzi F, Poletti A. Direct determination of the ethanol metabolites ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2005; 19: 1321–1331.
- 130** Schloegl H, Dresen S, Spaczynski K, Stoertzel M, Wurst FM, Weinmann W, Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue, and blood samples, *Intl. J. Legal Med*. 2006; 120: 83–88.

- 
- 
- 131** Morini L, Politi L, Zucchella A, Poletti A. Ethyl glucuronide and ethyl sulphate determination in serum by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2007; 376(1–2): 213–219.
- 132** Skopp G, Schmitt G, Potsch L, Dronner P, Aderjan R, Mattern, R. Ethyl glucuronide in human hair, *Alcohol Alcoholism*. 2000; 35: 283–285.
- 133** Janda I, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC–MS/MS, *Forensic Sci. Int.* 2002; 128: 59–65.
- 134** Jurado C, Soriano T, Gimenez M.P, Menendez M. Diagnosis of chronic alcohol consumption: Hair analysis for ethyl-glucuronide. *Forensic Sci. Int.* 2004; 145: 161–166.
- 135** Yegles M, Labarthe A, Auwärter V, Hartwig S, H. Vater, Wennig R, et al. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers, and teetotalers, *Forensic Sci. Int.* 2004; 145: 167–173.
- 136** Martins L, Binz T, Yegles M. The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair. *Forensic Sci. Int.* 2012; 218: 123–125.
- 137** L. Morini, L. Politi, A. Groppi, C. Stramesi, A. Poletti, Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 41(2006) 34–42.
- 138** Křivánková L, Caslavská J, Maláškova H, Gebauer P, Thormann W. Analysis of ethyl glucuronide in human serum by capillary electrophoresis with sample self-stacking and indirect detection. *Journal of Chromatography A*. 2005;1081(1):2–8.

- 
- 
- 139** Schloegl H, Rost T, Schmidt W, Wurst FM, Weinmann W. Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. *Forensic Sci Int.* 2006; 156(2–3): 213-218.
- 140** Thierauf A, Kempf J, Perdekamp MG, Auwärter V, Gnann H, Wohlfarth A, *et al.* Ethyl sulphate and ethyl glucuronide in vitreous humor as postmortem evidence marker for ethanol consumption prior to death. *Forensic Sci Int.* 2011; 210(1–3):63-8.
- 141** Rohrig TP, Huber C, Goodson L, Ross W. Detection of ethylglucuronide in urine following the application of Germ-X. *J Anal Toxicol.* 2006; 30(9):703-4.
- 142** Costantino A, DiGregorio EJ, Korn W, Spayd S, Rieders F. The effect of the use of mouthwash on ethylglucuronide concentrations in urine. *J Anal Toxicol.* 2006; 30(9):659-62.
- 143** Instituto Anatómico Forense de Madrid. Estadística del laboratorio de toxicología y bioquímica. Madrid: Instituto Anatómico Forense de Madrid; 2015.
- 144** Biotage. Simultaneous Extraction of Ethyl Glucuronide (EtG) and Ethyl Sulphate (EtS) from Urine with EVOLUTE AX Prior to LC-MS-MS Analysis. *Lc Gc Eur.* 2012:15.
- 145** Ministerio de Justicia – España. Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, miércoles 19 de mayo de 2010.
- 146** Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Exposición a agentes biológicos: seguridad y buenas prácticas de laboratorio. NTP 376. España; 1995.

- 
- 
- 147** Society of Hair Testing. Recommendations for Hair Testing in Forensic Cases. [Internet]. Sevilla: SOHT; 2004. [acceso 2014]. Disponible en: [http://soht.org/images/pdf/Consensus\\_on\\_Hair\\_Analysis.pdf](http://soht.org/images/pdf/Consensus_on_Hair_Analysis.pdf)
- 148** CSIC, Ministerio de Educación y Ciencia. Manual de buenas prácticas de laboratorio. Servicio de prevención de riesgos laborales del CSIC. Sevilla; 2007.
- 149** Musshoff F. Chromatographic Methods for the Determination of Markers of Chronic and Acute Alcohol Consumption." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002;781(1-2):457-80.
- 150** Phenomenex. Blood Alcohols on ZB-BAC-2. [Internet]. [2015; Consulta: 2013]. Disponible en: <http://www.phenomenex.com/Application/Detail/17983>
- 151** Caplan YH, Levine B. Evaluation of the Abbott TDx-Radiative Energy Attenuation (REA) ethanol assay in a study of 1105 forensic blood specimens. J. Forensic Sci. 1987; 32:55-61.
- 152** Crunelle CL, Yegles M, van Nuijs AL, Covaci A, De Doncker M, Maudens KE, *et al.* Hair ethyl glucuronide levels as a marker for alcohol use and abuse: A review of the current state of the art. Drug Alcohol Depend. 2014; 134:1-11.
- 153** Wurst FM, Kempter C, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide - A marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. Alcohol Alcoholism. 1999;34(1):71-7.
- 154** Wurst FM, Kempterb C, Metzgerb J, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. Alcohol. 2000; 20:111-116.

- 
- 
- 155** Høiseth G, Karinen R, Christophersen AS, Olsen L, Normann PT, Mørland J. A study of ethyl glucuronide in post-mortem blood as a marker of ante-mortem ingestion of alcohol. *Forensic Sci Int.* 2007; 165: 41–45.
- 156** Concheiro M, Cruz A, Mon M, de Castro A, Quintela O, Lorenzo A, Lopez-Rivadulla M.. Ethylglucuronide determination in urine and hair from alcohol withdrawal patients. *J Anal Toxicol.* 2009; 33(3): 155-161.
- 157** Askgaard G, Grønbæk M, Kjær M, Tjønneland A, Tolstrup JS. Alcohol drinking pattern and risk of alcoholic liver cirrhosis: A prospective cohort study. *Journal of Hepatology.* 2015; 62(5):1061-1067.
- 158** Theise ND. Histopathology of alcoholic liver disease. *Clinical Liver Disease.* 2013; 2(2): 64-67.
- 159** Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis.* 2015; 239(1): 192-202.
- 160** Torres F, Farina González, J. Manual de técnicas en histología y anatomía patológica. Barcelona-España: Ariel; 2002.
- 161** López A, Palacio M. Histología especial humana: manual de prácticas. Cádiz-España: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz. 2006.
- 162** Pagano, M., Kimberlee, G. Fundamentos de Bioestadística. México: International Thomson Editores; 2001.
- 163** Wayne, D. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. México: Grupo Noriega Editores; 2009.
- 164** Namakforoosh MN. Metodología de la investigación. 2º Ed. México: Limusa; 2000.

- 
- 165** Sokal RR, Rohlf FJ. Introducción a la Bioestadística. 1º Ed, Reimpresión. Barcelona-España.: Reverté; 2002.
- 166** Berlanga V, Rubio MJ, Vilà R. Cómo aplicar árboles de decisión en SPSS. [Internet] REIRE. 2013; 6 (1): 65-79. Disponible en: <http://revistes.ub.edu/index.php/REIRE/article/view/615/7229>
- 167** Sundström M, Jones AW, Ojanperä I. Utility of urinary ethyl glucuronide analysis in post-mortem toxicology when investigating alcohol-related deaths. Forensic Sci Int. 2014; 241: 178–182.
- 168** Egli M, Koob GF, Edwards S. Alcohol dependence as a chronic pain disorder. Neurosci Biobehav R. 2012; 36(10):2179-92.
- 169** Mangado, E. Consumo de alcohol y salud laboral. Revisión y líneas de actuación. Med Segur Trab. 2011; 57 (1): 173-187.
- 170** Hoiseth G, Yttredal B, Karinen R, Gjerde H, Morland J, Christophersen A. Ethyl glucuronide concentrations in oral fluid, blood, and urine after volunteers drank 0.5 and 1.0 g/kg doses of ethanol. J Anal Toxicol. 2010; 34(6):319-24.

